

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 1 月 18 日 (18.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/04299 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, C07K
14/47, 16/18, C12N 5/10, A61K 45/00, 48/00, 31/711,
A61P 25/28, G01N 33/15, 33/50

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04515

(22) 国際出願日: 2000 年 7 月 6 日 (06.07.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/194179 1999 年 7 月 8 日 (08.07.1999) JP
60/159,586 1999 年 10 月 18 日 (18.10.1999) US

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE)
[JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那 1532 番地 3
Chiba (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 太田紀夫 (OTA,
Toshio) [JP/JP]; 〒251-0042 神奈川県藤沢市辻堂新町
1-2-7-105 Kanagawa (JP). 磯貝隆夫 (ISOGAI, Takao)
[JP/JP]; 〒300-0303 茨城県稲敷郡阿見町大室 511-12
Ibaraki (JP). 西川哲夫 (NISHIKAWA, Tetsuo) [JP/JP];

〒173-0013 東京都板橋区氷川町 27-3-403 Tokyo (JP).
河合弓利 (KAWAI, Yuri) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県
木更津市矢那 4508-19-201 Chiba (JP). 山崎真也子
(YAMAZAKI, Mayako) [JP/JP]; 〒302-0022 茨城県取
手市本郷 2 丁目 11 番 9 Ibaraki (JP). 佐藤 晋 (SATO,
Susumu) [JP/JP]; 〒300-2436 茨城県筑波郡谷和原村
絹の台 6-19-11 Ibaraki (JP). 荒川弘之 (ARAKAWA,
Hiroyuki) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音
台 1-22-9 Ibaraki (JP). 森田正彦 (MORITA, Masahiko)
[JP/JP]; 〒300-1234 茨城県牛久市中央 1-20-1-2-103
Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階
Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

[続葉有]

(54) Title: AMYLOID β PROTEIN AGGLUTINATION CONTROLLING FACTOR

(54) 発明の名称: アミロイド β 蛋白凝集調節因子

(57) Abstract: A protein inhibiting or promoting the agglutination or sedimentation of amyloid β protein; a polynucleotide encoding the same; a method for screening a compound inhibiting or promoting the agglutination or sedimentation of amyloid β protein; and drugs for treating or preventing Alzheimer's diseases which contain a compound controlling the activity of the protein inhibiting or promoting the agglutination or sedimentation of amyloid β protein.

(57) 要約:

本発明は、アミロイド β 蛋白の凝集、沈着を抑制または促進するタンパク質およびそれをコードするポリヌクレオチドを提供する。また本発明は、アミロイド β 蛋白の凝集、沈着を抑制または促進する化合物のスクリーニング方法を提供する。さらに本発明は、該アミロイド β 蛋白の凝集、沈着を抑制または促進するタンパク質の活性を制御する化合物を含有するアルツハイマー病の治療または予防のための医薬を提供する。



WO 01/04299 A1



(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明細書

アミロイド β 蛋白凝集調節因子

技術分野

本発明は、アミロイド β 蛋白（以下 $A\beta$ ともいう）の凝集、沈着を抑制または促進するタンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを用いた該タンパク質の製造方法、並びにそれらの製造に関わる発現系、該発現系を用いたアミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進する化合物のスクリーニング方法に関する。また、本発明は上記方法により得られるタンパク質もしくはスクリーニングにより得られる化合物を用いるアルツハイマー病の治療ならびに予防方法等に関する。

背景技術

アルツハイマー病は、認知機能の障害を伴う疾患で、神経細胞の消失とともに多数の老人斑、神経原線維変化の出現を特徴としている。老人斑は、発症過程の最も早い時期から検出され、他の神経変性疾患では見られず疾患特異性は高い。アミロイド β 蛋白は老人斑を構成する主要成分であり、 β シート構造をもつアミロイド繊維を形成する。 $A\beta$ は約40個のアミノ酸残基からなる分子量約4000のポリペプチドである。凝集性が高く、容易に繊維を形成して不溶化する。その主要分子種として40番目のアミノ酸残基バリンで終わる $A\beta$ 40と更に2残基長い $A\beta$ 42がある。 $A\beta$ は通常は分解され脳内に蓄積しないが、老化と共に分解能力が低下して蓄積がおこり、これが元で神経機能不全や神経細胞死が起こり、最終的に痴呆やアルツハイマー病が発症するといわれている。種々の遺伝子解析や分子生物学的・神経薬理学的研究によりこのアルツハイマー病の疾患の原因

として「アミロイド仮説」が唱えられている。

発明の開示

本発明の目的は、アミロイド β 蛋白の凝集、沈着を抑制または促進するタンパク質およびそれをコードするポリヌクレオチドを提供するとともに、さらにはアミロイド β 蛋白の凝集、沈着を抑制または促進する方法または物質を見いだすことにより、アルツハイマー病の治療の方法を提供することである。

本願発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、神経前駆細胞より、アミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進する分泌または膜結合型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを見だし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は以下に示す通りである。

〔1〕 下記（a）から（e）のいずれかに記載のアミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（a）配列番号：1，3，5，7，および9のいずれかに記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（b）配列番号：2，4，6，8，および10のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

（c）配列番号：2，4，6，8，および10のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

（d）配列番号：1，3，5，7，および9のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

- (e) 配列番号：1，3，5，7，および9のいずれかに記載の塩基配列において、少なくとも(1) 60%のホモロジー、(2) 70%のホモロジー、(3) 80%のホモロジー、(4) 90%のホモロジー、または(5) 95%のホモロジーを有するポリヌクレオチド、
- [2] [1] のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- [3] [1] および[2] のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされるペプチドまたはタンパク質。
- [4] [1] のポリヌクレオチドと分子進化上、同一の遺伝子を起源とするポリヌクレオチドによってコードされる、アミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進するタンパク質。
- [5] [1] および[2] のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
- [6] [1] および[2] のいずれかに記載のポリヌクレオチド、または[5] のベクターを保持する形質転換体。
- [7] [6] の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、[3] のペプチドまたはタンパク質の製造方法。
- [8] [1] および[2] のいずれかに記載のポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなる少なくとも15塩基の長さを有するポリヌクレオチド。
- [9] [3] のペプチドまたはタンパク質に対する抗体。
- [10] [3] のペプチドまたはタンパク質と[9] の抗体の免疫学的な反応を観察する工程を含む、免疫学的測定方法。
- [11] アミロイド β 蛋白の存在下、[1] のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質または該タンパク質を発現する細胞に候補化合物を接触させ、アミロイド β 蛋白の凝集または沈着を調節する候

補化合物を選択することを特徴とする、〔１〕のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の活性を制御する化合物をスクリーニングする方法。

〔１２〕 次の工程を含む、〔１〕のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の発現を制御する化合物をスクリーニングする方法。

(1) 配列番号：１、配列番号：３、配列番号：５、配列番号：７、および配列番号：９から選択されるいずれかに記載の塩基配列からなる遺伝子の発現制御領域と、その下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、

(2)前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、および

(3) 対照と比較して、工程(2)におけるレポーター活性を増加または減少させる候補物質を選択する工程

〔１３〕 〔１１〕および〔１２〕のいずれかに記載の方法で得ることができる化合物を含有する医薬。

〔１４〕 〔３〕および〔４〕のいずれかに記載のペプチドまたはタンパク質を含有する医薬。

〔１５〕 〔１〕のポリヌクレオチドのタンパク質コード配列に対するアンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬。

〔１６〕 アルツハイマー病の予防剤または治療剤である、〔１３〕および〔１４〕のいずれかに記載の医薬。

〔１７〕 次の工程を含む、アルツハイマー病の検出方法。

(1) 〔１〕のポリヌクレオチドの発現状態を測定する工程、

(2) (1)の測定結果を正常な状態における前記ポリヌクレオチドの発現状態と比較する工程、

(3) 比較の結果、前記ポリヌクレオチドの発現状態の変化をアルツハイマー病と関連付ける工程

本発明のアミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進するタンパク質および該タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、配列番号：1、3、5、7、または9で示される配列の全部またはその一部の配列を有する。

本発明のポリヌクレオチドとしては、本発明のタンパク質をコードするものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNA の他、ゲノム DNA、化学合成 DNA など含まれる。また、本発明のタンパク質をコードする限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、上記のように、配列番号：1、3、5、7または9に記載のポリヌクレオチド配列もしくはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれらポリヌクレオチド配列の情報に基づき設計したプライマーを用いた PCR 法等の常法により単離することが可能である。

本発明のタンパク質であるアミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進するタンパク質は、例えば配列番号：1、3、5、7、または9で示される配列のオープンリーディングフレームの配列を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体で発現させることにより得ることができる。これらの発現タンパク質は、培養液または細胞画分より常法により精製・単離することができる。精製・単離するための方法として、具体的には、例えば、以下の方法が挙げられる。まず、濾過および遠心等の常法により細胞または上清を集め、細胞については当該細胞の細胞壁および／または細胞膜を、例えば超音波および／またはライソザイムで処理して細胞膜画分を得る。次に、得られる細胞膜画分を適当な水溶液に溶解する。そして該上清もしくは該細胞膜画分から、天然または合成タンパク質を精製並びに単離するために一般に用いられる常法に従って本発明のタンパク質を単離、精製する。単離、精製方法としては、透析、ゲル濾過、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに対するモノクローナル抗体を用いたアフィニティー

カラムクロマトグラフィー、適当な吸着材上でのカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどが例示される。

また、本発明には、上記のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。ここで「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が、アミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進する活性を有することを意味する。アミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進する活性は、たとえば実施例に示すような方法により確認することができる。すなわち、 $A\beta$ やその断片は特定の条件下では凝集しやすい性質を持っている。このような条件のもとで、被検蛋白質を添加することにより、もしもその蛋白質が $A\beta$ の凝集を促進する性質を持っていれば、 $A\beta$ の凝集としてその性質を捉えることができる。たとえば $A\beta$ のN末端側1-28位のアミノ酸配列からなる断片は、 $A\beta$ の凝集活性を備えた部分ペプチドとしてこの種の試験に用いられている(Methods in Enzymology Vol.309, 274-284, 1999)。 $A\beta$ の凝集は光学的に検出することができる。あるいはコンゴレッド等による染色後に顕微鏡で確認することもできる。

これら本実施例において β アミロイド凝集試験に用いられたタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、当業者であれば、例えば、タンパク質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法（例えば、部位特異的変異誘発法(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 8.1-8.5))を利用して調製することができる。また、このようなタンパク質は、自然界におけるアミノ酸の変異により生じることもある。本発明には、このように本実施例において同定されたタンパク質と同等の機能を有する限り、そのアミノ酸配列（配列番号：2、4、6、8または10、あるいは配列番号1、3、5、7または9でコードされるタンパク質のアミノ酸配列）において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などにより異なるタ

ンパク質も含まれる。本発明において複数のアミノ酸とは、

タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。あるいは本発明には複数のアミノ酸として数個のアミノ酸の変異を置換する場合が含まれる。数個とは、たとえば5、更には4または3、あるいは2、更には1のアミノ酸を言う。置換されるアミノ酸は、タンパク質の機能の保持の観点から、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trp は、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln が挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、Asp および Glu が挙げられる。また、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、His が挙げられる。

また、本実施例において同定されたタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、当業者に周知のハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子増幅技術を利用して単離することも可能である。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 6.3-6.4) を用いて本実施例において同定されたタンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列 (配列番号: 1、3、5、7 または 9) またはその一部をもとにこれと相同性の高いポリヌクレオチドを単離して、該ポリヌクレオチドから機能的に同等なタンパク質を得ることは、通常行いうることである。本発明には、本実施例において同定されたタンパク質と同等の機能を有する限り、これらタンパク質をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質も含まれる。機能的に同等なタンパク質を単離する生物としては、例えば、ヒト、マウ

ス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ等の脊椎動物が挙げられるが、これらに制限されない。これらの動物からは、本発明によるアミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進するタンパク質の遺伝子と分子進化上同一の遺伝子を起源とする遺伝子を単離することができる。なお本発明において「分子進化上同一の遺伝子を起源とする」とは、そのポリヌクレオチド塩基配列分析、生理学的役割等の解析により、分子進化上、ヒトにおける本発明の遺伝子と同一の遺伝子を起源として進化してきたと合理的に判断される遺伝子を言う。このような遺伝子は、その塩基配列において、高度な相同性を維持している。

機能的に同等なタンパク質をコードするポリヌクレオチドを単離するためのハイブリダイゼーションのストリンジェントな条件は、通常は洗浄のための条件として「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度であり、さらに厳しい条件としては「0.1xSSC、0.1% SDS、65℃」程度であり、ハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するポリヌクレオチドの単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるタンパク質は、配列番号：2、4、6、8または10に記載の本発明のタンパク質または配列番号1、3、5、7または9でコードされるタンパク質と比較して、通常、そのアミノ酸配列または該タンパク質をコードする塩基配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも60%以上、好

ましくは 70%以上、さらに好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上、最も好ましくは 95%以上の配列の同一性を指す。相同性の特定は、BLAST2 検索アルゴリズム (Altschul, S.F. et al, 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) を用いて決定することができる。

また、遺伝子増幅技術 (PCR) (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4) を用いて、本実施例において同定されたポリヌクレオチド配列 (配列番号: 1、3、5、7 または 9) の一部をもとにプライマーを設計し、これらポリヌクレオチド配列またはその一部と相同性の高いポリヌクレオチド断片を単離して、これをもとに本実施例において同定されたタンパク質と機能的に同等なタンパク質を得ることも可能である。

また、本発明は、本発明のタンパク質の部分ペプチド、および該部分ペプチドのコードするポリヌクレオチドに関する。本発明の部分ペプチドは、少なくとも 7 アミノ酸、好ましくは 9 アミノ酸以上、より好ましくは 12 アミノ酸以上、より好ましくは 15 アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造する。

また本発明は、前記ポリヌクレオチドのいずれかを含有する発現ベクターを提供するものである。さらに、本発明は、前記ポリヌクレオチド、あるいは前記いずれかの発現ベクターを保持する形質転換体、並びにその形質転換体を培養し、その培養物から本発明のタンパク質を単離することからなる、アミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進するタンパク質、あるいはその部分ペプチドの製造方法に関するものである。さらに本発明は、上記の方法で製造されたタンパク質、あるいはその部分ペプチドを提供す

るものである。

遺伝子組換え手法でポリペプチドを生産する場合、宿主細胞の種類により、目的ポリペプチドのグリコシル化の種類や程度の異なったものが得られることや、いわゆるポリペプチドの分泌生産法において、宿主細胞中で発現された前駆体ポリペプチドの末端(N-末端および/またはC-末端)アミノ酸配列がシグナル・ペプチダーゼ等によりプロセッシングを受け、種々の末端アミノ酸配列を持つポリペプチドが得られることは当業者に周知である。従って、そのようなポリペプチドも本発明のタンパク質の範囲に含まれることは、当業者ならば容易に理解し得ることである。

下記実施例には、発現ベクターとして哺乳類動物細胞内で機能するベクターの構築例のみが示されている。しかしながら、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドが開示されている結果、これらに基づいて、酵母等の真菌類、並びに原核性細胞宿主に導入したとき、該宿主に本発明のタンパク質を発現、産生させ得る発現ベクターを構築することは、当業者にとって容易である。従って、本発明は、本発明のポリヌクレオチド配列に基づき、当該技術分野既知の方法で構築される発現ベクターをも包含するものである。

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを発現させるために用い得る微生物細胞には、例えば、原核性の細菌[大腸菌(*Escherichia coli*)や枯草菌(*Bacillus subtilis*)]および真核性の酵母[例えばパン酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)]がある。また、哺乳類細胞には培養ヒト細胞および培養動物細胞が含まれる。さらには培養植物細胞も用い得る。

微生物の例としてはエシェリキア属に属する細菌(例えばE.coli HB101 ATCC 33694、E. coli HB101-16 FERM BP-1872、E. coli MM294 ATCC 31446、E. coli DH1 ATCC 33849 等)およびパン酵母(例えば S. cerevisiae AH22 ATCC 38626 等)がある。哺乳動物細胞の例としてはヒト胎児腎臓由来 H E

K 2 9 3 細胞、マウス L 9 2 9 細胞およびチャイニーズ・ハムスター・オバリー (CHO) 細胞等がある。

通常、原核生物である細菌、特に大腸菌を宿主細胞として用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明のタンパク質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、終止コドンおよび自己複製可能ユニット(単位)から構成される。真核生物、即ち酵母や哺乳動物細胞を宿主細胞として用いる場合、発現ベクターは、少なくともプロモーター、開始コドン、本発明のタンパク質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドおよび終止コドンから構成されるのが好ましい。さらにエンハンサー配列、本発明のタンパク質の 5' - および 3' - 非コード領域、ポリアデニル化部位および自己複製可能単位を挿入することもできる。

上記の自己複製可能単位は、形質転換体の選択マーカー(たとえば、アンピシリン耐性)を含有していることが好ましい。細菌を宿主とする発現ベクターの場合、プロモーターという語句は、プロモーター、オペレーターおよびシャイン・ダルガーノ (SD) 配列(たとえば AAGG 等)からなるプロモーター・オペレーター領域を意味する。そのようなプロモーターの例としては、慣用のプロモーター・オペレーター領域(たとえば、ラクトースオペロン、P L - プロモーター、trp - プロモーター等)が挙げられる。酵母を宿主とする発現ベクターに用いられるプロモーターの例としては pho5 プロモーターが挙げられる。更に、精製を容易に行うことを目的として、金属イオンキレートに対する親和性を持つ塩基性アミノ酸を、本発明のタンパク質におけるいずれかの末端に付加することができる。

塩基性アミノ酸を付加する場合には、所望のアミノ酸をコードする塩基配列が連続した塩基配列を 5' 側に付加したプライマーを用いて、PCR を行えば、目的とする遺伝子の任意の末端に、オリゴペプチドを付加することができる。塩基性アミノ酸としては、ヒスチジン、リジン、あるいはアル

ギニンなどを用いることができる。

哺乳動物細胞における発現ベクターに用いられるプロモーターの例としては、HTLV-LTR プロモーター、SV40 初期および後期プロモーター、CMV プロモーター、マウス・メタロチオネイン I (MMT) -プロモーター等が挙げられる。好ましい開始コドンの例としてメチオニンコドン (ATG) が挙げられる。

本発明のタンパク質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、たとえば、DNA 合成装置を用いて、部分合成または全合成することによって得ることができる。あるいは、ヒト cDNA ライブラリーより、配列番号：1、3、5、7 または 9 に記載の塩基配列に基づいて設定したプローブやプライマーを用いて取得することができる。更に、ゲノム DNA を常法通り処理する（たとえば、制限酵素による消化、細菌アルカリホスファターゼによる脱リン酸化、T4 ポリヌクレオチドキナーゼによるリン酸化、T4 DNA リガーゼを用いたライゲーション）ことによって、本発明のタンパク質をコードするゲノム DNA を調製することができる。更にこのようにして取得したゲノム DNA を利用し、ゲノムにおける本発明の遺伝子の転写開始点を明らかにし、より上流に位置する発現制御領域を特定することができる。本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するプロモーターやエンハンサー等の制御領域は、本発明のタンパク質の発現異常を検出するための標的領域として有用である。あるいは、これらの領域を標的とするデコイ核酸医薬などにより、発現制御を実現することができる。

また、本発明の宿主細胞には、本発明のタンパク質の機能解析やこのタンパク質を利用したその機能阻害剤や機能促進剤のスクリーニングのために用いる目的の細胞も含まれる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley &

Sons. Section 9.1-9.9)、リボフェクタミン法、マイクロインジェクション法などの方法で行うことが可能である。形質転換体からの本発明のタンパク質の調製は、当業者に公知のタンパク質の分離・精製法を利用して行なうことができる。

本発明はまた、配列番号：1、3、5、7または9に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T(A:U)、G:Cの塩基対からなる2本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。

このようなポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質をコードするDNAやRNAを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のポリヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは15bp~35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15bpの鎖長のポリヌクレオチドが用いられる。プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的である必要があるが、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質の異常を検査・診断するために利用することができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドをプローブやプライマーとして用いたノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCRにより、発現異常を検査することができる。本発明において「発現」

とは、転写および/または翻訳が含まれる。本発明のポリヌクレオチドを用いた発現の解析により、遺伝子の転写レベルでの発現を検査・診断することができる。また、後述の本発明のタンパク質に対する抗体を用いれば、遺伝子の翻訳レベルでの発現を検査・診断することができる。また、本発明のポリヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によりゲノム DNA-PCR や RT-PCR により本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドやその発現制御領域を増幅し、RFLP 解析、SSCP、シーケンシング等の方法により、配列の異常を検査・診断することができる。

また、「配列番号：1、3、5、7または9に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド」には、本発明のタンパク質の発現を抑制するためのアンチセンスポリヌクレオチドが含まれる。アンチセンスポリヌクレオチドは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp、さらに好ましくは500bp以上の鎖長を有し、通常、3000bp以内、好ましくは2000bp以内の鎖長を有する。

このようなアンチセンスポリヌクレオチドには、本発明のタンパク質の異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。具体的には、アルツハイマー病においては、アミロイド β 蛋白の凝集・沈着が引き金となり脳神経細胞死や神経機能不全へ導くと考えられている。従って、本発明のアミロイド β 蛋白の凝集を促進するタンパク質の発現を阻害できれば、アルツハイマー病の治療または発症の予防に用いることができる。また、本発明のアミロイド β 蛋白の凝集を抑制するタンパク質の発現を阻害できれば、アミロイド β 蛋白の凝集を促進しアルツハイマーのモデルを作成することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、配列番号：1、3、5、7または9に記載のポリヌク

レオチドの配列情報を基にホスホロチオエート法 (Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988)) などにより調製することが可能である。

本発明のポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo 法や in vivo 法などにより患者へ投与を行う。

本発明は、また、本発明のタンパク質に結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、本発明の蛋白質または部分ペプチドを合成して家兎に免疫することにより得ることが可能であり (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.12~11.13)、一方、モノクローナル抗体の場合には、本発明の蛋白質または部分ペプチドを用いてマウスを免疫し、脾臓細胞と骨髓腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。

本発明のタンパク質に結合する抗体は、本発明のタンパク質の精製に加え、例えば、これらタンパク質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などからタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法による本発明のタンパク質の検出を通して、発現や構造の異常の

有無を検査・診断することができる。

本発明のタンパク質に結合する抗体は、本発明のタンパク質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウス（例えば、「Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendez, M.J. et al.(1997) Nat.Genet.15:146-156」参照）に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組み換えによって調製することができる(Methods in Enzymology 203, 99-121(1991))。

本発明のタンパク質のうち、配列番号：1、3または7のポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質は、実施例において示すようにアミロイド β 蛋白の凝集抑制活性を持ち、アルツハイマー病患者においては、その発現量は減少している。従って、これらのタンパク質の発現を増強することにより、アミロイド β 蛋白の凝集を抑制しアルツハイマー病の治療及び発症の予防に有効である。さらに、これらのタンパク質およびその機能的に同等なタンパク質は、それ自身でアルツハイマー病の治療及び発症の予防剤として使用することもできる。

また、本発明のタンパク質のうち、配列番号：5または9のポリヌクレオチドによりコードされたタンパク質は実施例において示すようにアミロイド β 蛋白の凝集促進活性を持ち、アルツハイマー病患者においては、その発現量は増加している。従って、これらのタンパク質の発現を減少させることにより、アミロイド β 蛋白の凝集を抑えアルツハイマー病の治療及び発症の予防に有効である。

さらに、本発明のタンパク質は、他のアミロイドーシス症、具体的には、

精神分裂病およびそれに関連した神経障害、慢性関節リウマチ、結核、らい病、気管支拡張症、全身性エリテマトーデス（SLE）、透析アミロイドーシス症、糖尿性アミロイドーシス症、心房性アミロイドーシス症等の疾患に関係すると期待され、これらの疾患の治療及び発症の予防剤として、または治療・予防剤のスクリーニングにも使用できる。

また、本発明は、本発明のタンパク質の活性を調節する化合物のスクリーニング方法を提供する。本発明のタンパク質はアミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進することから、当該遺伝子の産物の発現を調節する化合物はアミロイド β 蛋白の凝集を調節することにより、アルツハイマー病を治療または予防する薬剤として有用である。このスクリーニング方法は、以下のとおりである。

アミロイド β 蛋白の凝集が生じる条件下で、本発明のタンパク質または本発明のタンパク質を発現する細胞に候補化合物を接触させ、アミロイド β 蛋白の凝集を抑制する候補化合物を選択する。

より具体的には、アミロイド β 蛋白（A β 40、A β 42、A β 28等）を含む溶液に、本発明のタンパク質、例えば配列番号：1、3、5、7または9のヌクレオチドがコードしているタンパク質、または該タンパク質と機能的に同等なタンパク質、あるいはこれらのタンパク質を発現している細胞、並びに候補化合物をインキュベーションし、さらにその凝集度合いを測定するために、例えば凝集したアミロイド β 蛋白に結合する蛍光色素、例えば thioflavin-T を用いその蛍光強度を測定することができる。

本発明のタンパク質のうち、配列番号：1、3または7のポリヌクレオチドによりコードされたタンパク質の発現を増加させることにより、アミロイド β 蛋白の凝集を抑制しアルツハイマー病の治療及び発症の予防に有効である。さらに、配列番号：5または9のポリヌクレオチドによりコードされたタンパク質の発現を減少させることにより、アミロイド β 蛋白の

凝集を抑えアルツハイマー病の治療及び発症の予防に有効である。従って、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現制御を調節する化合物はアルツハイマー病の治療及び発症の予防剤として有用である。すなわち本発明は、次の工程を含む、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の発現を制御する化合物をスクリーニングする方法に関する。

(1) 配列番号：1に記載の塩基配列からなる遺伝子の発現制御領域と、その下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、

(2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、および

(3) 対照と比較して、工程(2)におけるレポーター活性を増加または減少させる候補物質を選択する工程

本発明のスクリーニングのために、当該遺伝子の制御領域を染色体DNAからクローニングし、本制御領域遺伝子の下流にレポーター遺伝子（例えばルシフェラーゼ、 β ガラクトシダーゼ、GFP (Green Fluorescent Protein) など）を結合させた発現プラスミドを作製する。配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、および配列番号：9からなる群のいずれかに記載の塩基配列からなる遺伝子の発現制御領域は、染色体DNAから公知の方法によってクローニングすることができる。たとえばS1マッピング法が転写開始点の特定方法として公知である（「転写調節領域の単離」および「転写制御因子の同定と精製」、「細胞工学 別冊8 新細胞工学実験プロトコル」、東京大学医科学研究所制癌研究部編 秀潤社1993年、p362-374）。一般に当該遺伝子の発現制御領域DNAは、ヒト染色体ライブラリー (genomic library) を、当該遺伝子の5'末端の15～100bp、好ましくは30～50bpをプローブDNAに用いてスクリーニングすることにより、発現制御領域を含む遺伝子クローンとしてクローニングされる。このようにして得られたクローンはしばしば10kbp以上の当該遺伝子の5'

非翻訳領域を包含している。そこで、これらのクローンの5'末端をエキソヌクレアーゼ処理などによって短縮化、あるいは断片化する。短縮された発現制御領域を含む配列でレポーター遺伝子の発現の強さや発現の制御についての評価を行うことによって、発現制御領域の活性維持のための最小必要単位を得ることができる (deletion study)。また、遺伝子の発現制御領域をNeural Network を用いて予測するプログラムが公知である (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html, Reese, M. G., et al, "Large Scale Sequencing Specific Neural Networks for Promoter and Splice Site Recognition" Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium, edited by Lawrence Hunter and Terri E. Klein, World Scientific Publishing Co, Singapore, January 2-7, 1996)。あるいはPromoter Scanのような転写因子結合配列を検索して発現制御領域を予測するプログラムを用い活性の最小単位を予測することも行われている (<http://biosci.cbs.umn.edu/software/proscan/promoterscan.htm>, Prestridge, D.S. 1995, Prediction of Pol II Promoter Sequence using Transcription Factor Binding Sites. J. Mol. Biol. 249: 923-932)。また、予測されたコアの部分を中心にdeletion studyを実施することもできる。

このようにして単離された本制御領域遺伝子の下流に、レポーター遺伝子を機能的に結合させた発現プラスミドを作製し、本発現プラスミドを適当な細胞に導入する。本発明において、機能的な結合とは、前記発現制御領域の活性化によって、レポーター遺伝子の転写が開始されるように両者を結合することを意味する。レポーター遺伝子には、前記発現制御領域の活性化を遺伝子の発現として観察することができる蛋白質をコードするものであれば任意の遺伝子を利用することができる。具体的には、例えばル

シフェラーゼ、 β ガラクトシダーゼ、GFP (Green Fluorescent Protein) などの遺伝子がレポーター遺伝子として一般に用いられる。ベクターを導入する細胞には、例えば当該遺伝子を欠失させた動物細胞を用いることができる。次に本発現プラスミドにて例えば当該遺伝子を欠失させた動物細胞を形質転換させる。制御領域の転写活性によるレポーター遺伝子の発現は発色あるいは発光等として検出される。このような条件下で本細胞株を96 ウェルマルチプレートに播種し、スクリーニングの対象となる化合物を各ウェルに加えることにより、当該遺伝子の発現産物の発現を抑制あるいは促進する化合物が容易に選択可能である。化合物の選択法としては例えば、レポーター遺伝子として GFP を用いた場合、薬物を加えない状態および加える場合での GFP の発光量の比較を行うことにより選択が可能である。比較とは2倍以上もしくは1/2以下、好ましくは5倍以上もしくは1/5以下、より好ましくは10倍以上もしくは1/10以下の発光量比を示す場合のことを示唆している。本方法は動物細胞ばかりでなく同様なシステムでレポーター遺伝子の発現を引き起こすような宿主であれば、真核生物・原核生物を問わず用いることが可能である。

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられる。ここに記載した被検試料は例示であり、これらの具体例に制限されない。

このスクリーニングにより単離される化合物は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）の候補となる。また、生体内において、本発明のタンパク質とこれと相互作用する分子との該相互作用を阻害する化合物の候補となる。これら化合物は、本発明のタンパク質に関連する疾患の予防や治療のための医薬品として応用が考えられる。

更に本発明は、本発明のスクリーニングによって得ることができる化合物の医薬用途に関する。すなわち本発明は、前記スクリーニングによって得ることができる化合物を主成分として含有する、アルツハイマー病の治療及び発症の予防またはアミロイド β 蛋白の凝集の制御における使用に関する。あるいは本発明は、これらの化合物を主成分として含有することを特徴とする、アルツハイマー病の治療剤及び発症の予防剤に関する。さらに、本願発明の前記スクリーニング法で得られた化合物は、他のアミロイドーシス症、具体的には、精神分裂病およびそれに関連した神経障害、慢性関節リウマチ、結核、らい病、気管支拡張症、SLE、透析アミロイドーシス症、糖尿病性アミロイドーシス症、心房性アミロイドーシス症等の疾患に関係すると期待され、これらの疾患の治療及び発症の予防剤として、または治療・予防剤のスクリーニングにも使用できる。

本発明のタンパク質、ヌクレオチド、抗体および上記スクリーニングにより単離される化合物は、アミロイド β 蛋白の凝集を調節するために有用である。これらを医薬品として用いる場合には、それ自体を医薬品として用いることも可能であるが、公知の製剤学的方法により製剤化して用いることも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤などと適宜組み合わせ製剤化して用いることが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がポリヌクレオチドによりコードされうるものであれば、該ポリヌクレオチドを遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

本発明のタンパク質は、アミロイド β 蛋白の凝集の抑制または促進活性の他に、生理活性を持つことが予測される。それらは、以下の様な方法を用いて決定することができる。本発明のタンパク質は、分泌タンパク質あるいは膜タンパク質であり、そのアミノ酸配列が明らかとなっていることから、適当な発現系を適用して組み換え体として発現させることにより、あるいは、そのタンパクを特異的に認識する抗体を用いることで、アミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進する活性以外の生物学的活性を持つかどうか解析することが可能である。

本発明のタンパク質は、例えば「The Practical Approach Series」(IRL PRESS 社)の『Glycobiology』(M.Fukuda, A.Kobata 編、1993)、『Growth Factors』(I.McKay, I.Leigh 編、1993)、『Extracellular Matrix』(M.A.Haralson, J.R.Hassell 編、1995)、または、「Method in Molecular Biology」(Humana Press 社)シリーズの『Glycoprotein Analysis in Biomedicine』(Elizabeth F.Hounsell 編、1993)にもとづいて、それぞれのタンパク質の生物学的活性の解析が可能である。あるいは「日本生化学会編 新生化学実験講座 7 増殖分化因子とその受容体」(1991 年発行) 東京化学同人社や「Methods in Enzymology」 Academic Press 社の Volume 296 Neurotransmitter Transporters, Volume 294 Ion Channels (Part C), Volume 293 Ion Channels (Part B), Volume 292 ABC Transporters, Volume 288 Chemokine Receptors, Volume 287 Chemokines, Volume 248 Proteolytic Enzymes, Volume 245 Extracellular Matrix Components, Volume 244 Proteolytic Enzymes, Volume 230 Guide to Techniques in Glycobiology, Volume 198 Peptide Growth Factors, Volume 192 Biomembranes, Volume 191 Biomembranes, Volume 149 Drug and Enzyme Targeting 等の開示に基づいて、分泌タンパク質や膜タンパク質に関連する生物学的活性を解析することもできる。

分泌タンパク質、あるいは膜タンパク質を用いた機能の解析に基づいて、例えば以下のようにして医薬品開発を行うことができる。

膜タンパク質の場合、細胞上に発現して受容体やリガンドとして機能するタンパク質である可能性が高い。したがって、本発明によって提供される膜タンパク質を、公知のリガンドや受容体との結合活性に基づいてスクリーニングすれば、新たなリガンド-受容体の関係を見出すことができる。スクリーニングは公知の方法に従って行うことができる。

例えば、以下のようにして本発明のタンパク質の受容体を発現する細胞をスクリーニングすることができる。すなわち、(a) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに被検細胞試料を接触させる工程、および (b) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する細胞を選択する工程、とによって特定のタンパク質に結合する受容体のスクリーニングが可能である。

このスクリーニングは、例えば、以下のように行うことが可能である。まず、本発明のタンパク質を発現させ組換えタンパク質の精製品を取得する。次いで、その精製タンパク質を標識し、各種細胞株または初代培養細胞に対して結合アッセイを行い、これにより受容体を発現している細胞を選定する（本庶・新井・谷口・村松編 新生化学実験講座 7 増殖分化因子とその受容体 p203-236 (1991) 東京化学同人）。標識としては、¹²⁵I などの RI 標識のほか、酵素（アルカリホスファターゼ等）標識も可能である。また、本発明のタンパク質を標識せずに用いて、本発明のタンパク質に対する抗体を標識して用いて検出することも考えられる。上記スクリーニングにより得られた本発明のタンパク質の受容体を発現する細胞は、後述するように該受容体のアゴニストやアンタゴニストのスクリーニングに用いることが可能である。

上記のスクリーニングにより本発明のタンパク質の受容体やその受容体

を発現する細胞が得られれば、本発明のタンパク質とその受容体または該受容体を発現する細胞との結合活性を指標に、両者の結合を阻害する化合物（例えば、受容体アゴニストやアンタゴニスト）のスクリーニングが可能となる。

このスクリーニング方法は、（a）被検試料の存在下で、本発明のタンパク質を該タンパク質の受容体または該受容体を発現する細胞に接触させる工程、（b）該タンパク質とその受容体または該受容体を発現する細胞との結合活性を検出する工程、および（c）被検試料非存在下において検出した場合と比較して、該結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む。

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。また、本発明のタンパク質との結合活性を指標とした上記のスクリーニングにより単離された化合物を被検試料として用いることも可能である。

このスクリーニングにより単離される化合物は、本発明のタンパク質の受容体のアゴニストやアンタゴニストの候補となる。本発明のタンパク質とその受容体との結合活性の低下によるリン酸化などの細胞内シグナルの変化をもとに、得られた化合物が本発明のタンパク質の受容体のアゴニストであるかアンタゴニストであるかを判定することができる。また、得られる化合物は、生体内において、本発明のタンパク質と相互作用する分子（受容体も含む）との該相互作用を阻害する化合物の候補ともなる。これら化合物は、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防薬や治療薬への応用が考えられる。

分泌タンパク質の場合、細胞の増殖・分化などの細胞状態を制御する因子の可能性もある。新たな細胞状態を制御する因子を見いだすためには、

ある種の細胞に、本発明によって提供される分泌タンパク質を加えることによって、細胞の増殖・分化などの細胞状態変化や、細胞内の特定の遺伝子の活性化を指標にスクリーニングすれば可能である。

このスクリーニングは、例えば、以下のように行うことが可能である。まず、本発明のタンパク質を発現させ組換えタンパク質の精製品を取得する。次いで、その精製タンパク質を、各種細胞株または初代培養細胞に添加して、増殖・分化などの細胞の変化を調べる。または、ある特定の細胞状態変化に作用することが知られている遺伝子の誘導を mRNA 量、タンパク質量で検出する。あるいはある特定の細胞状態変化に作用することが知られている遺伝子産物（タンパク質）の働きにより変化した細胞内の物質（低分子化合物など）量で検出する。

このようなスクリーニングにより、本発明によるタンパク質が細胞状態、機能を制御するとなれば、本発明のタンパク質は、関連した疾患に対して、そのまま、あるいは一部適した状態に改変して、医薬品への応用が考えられる。

また、先に膜タンパクについて記述したように、本発明によって提供される分泌タンパク質を用いて、公知のリガンドや受容体との結合活性に基づいてスクリーニングすれば、新たなリガンドー受容体の関係を見出すことができ、同様の方法でアゴニスト、アンタゴニストの判定が可能となる。こうして得られる化合物は、生体内において、本発明のタンパク質と相互作用する分子（受容体も含む）との該相互作用を阻害する化合物の候補ともなる。これら化合物は、本発明のタンパク質が関連する疾患の予防薬や治療薬への応用が考えられる。

あるいは、このようなスクリーニングにより影響を受けたタンパク質や遺伝子が疾患に関連していた場合、本発明によるタンパク質を利用し、直接的に、または、間接的に、その発現や活性調節を行う化合物、遺伝子の

スクリーニングが可能となる。

例えば、まず、本発明のタンパク質を発現させ組換えタンパク質の精製品を取得する。次に影響を受けたタンパク質や遺伝子を精製し、その結合に基づいてスクリーニングを行う。または、予め阻害剤の候補となる化合物を加えておいた後、それら結合の変化を観察することによってスクリーニングを行う。このようなスクリーニングによって得られた化合物は、本発明によるタンパク質が関連した疾患に対して医薬品への応用が考えられる。スクリーニングによって得られた制御因子がタンパク質であっても、同様に、そのタンパク質の発現・活性に本来ない影響を与える化合物があれば、その化合物は、本発明によるタンパク質が関連した疾患に対して医薬品への応用が考えられる。

本発明による分泌タンパク質、あるいは膜タンパク質が酵素としての活性を有するとなれば、本発明によって提供されるタンパク質に化合物を適当な条件下で添加し、化合物の変化を指標としてその活性を明らかにすることができる。また、この活性を指標に本発明によるタンパク質の活性を阻害する化合物のスクリーニングも可能である。

このスクリーニングは、例えば、以下のように行うことが可能である。まず、本発明のタンパク質を発現させ組換えタンパク質の精製品を取得する。次いで、その精製タンパク質に、化合物を添加して、化合物量および反応生成物量を調べる。または、予め阻害剤の候補となる化合物を加えておいた後、精製タンパク質と反応する化合物（基質）を加えて、その基質量および反応生成物量の変化を調べる。

このようなスクリーニングにより、得られた化合物は、本発明のタンパク質が関連した疾患に対して、医薬品への応用が考えられる。

本発明の分泌タンパク質、あるいは膜タンパク質が、新たな疾患関連タンパク質であるかどうかは、上記に挙げた以外にも、本発明によるタンパ

ク質の特異認識抗体を用いて、特定の疾患とタンパク質の発現量や活性との相関を調べることにより知ることができる。あるいは、「Method in Molecular Biology」(Humana Press 社)シリーズの『Molecular Diagnosis of Genetic Diseases』(Rob Elles 編、1996)を参考に解析が可能である。

本発明のタンパク質に結合する抗体は、本発明のタンパク質の精製に加え、例えば、本発明のタンパク質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などからタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法による本発明のタンパク質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。

更に本発明のポリヌクレオチドは、アルツハイマー病患者の海馬において発現の異常が観察された。したがって、本発明のポリヌクレオチドの発現状態を測定することによって、アルツハイマー病を検出することができる。すなわち本発明は、以下の工程を含む、アルツハイマー病の検出方法に関する。

(1) 配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、および配列番号：9からなる群から選択された少なくとも1つの配列番号として記載のポリヌクレオチドの発現状態を測定する工程、

(2) (1)の測定結果を正常な状態における前記ポリヌクレオチドの発現状態と比較する工程、

(3) 比較の結果、前記ポリヌクレオチドの発現状態の変化をアルツハイマー病と関連付ける工程

本発明において、前記ポリヌクレオチドの発現状態は、遺伝子が mRNA に転写され、蛋白質に翻訳される工程のいずれかの段階を解析することによって明らかにすることができる。より具体的には、たとえば前記塩基配列からなる mRNA を前記ポリヌクレオチドとして測定することにより、転写状

態を知ることができる。mRNAは、ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR等の公知の手法によって測定することができる。あるいは、前記ポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなる蛋白質やその断片を測定すれば、蛋白質への翻訳の状態を知ることができる。蛋白質はそれを認識する抗体を用いたウエスタンブロット法や各種のイムノアッセイによって測定することができる。本発明による検査方法は、患者の血液試料や髄液試料を対象として実施することができる。あるいは、剖検によって採取された海馬組織を対象とすることもできる。組織標本を試料として本発明のポリヌクレオチドの発現状態を観察するには、インサイチュハイブリダイゼーションや組織免疫学的な解析手法が利用される。本発明のポリヌクレオチドの発現状態を解析し、たとえば PSEC256 の発現状態が脳に異常が無い場合の結果と比較して亢進していればアルツハイマー病と関連付けることができる。また、PSEC0012、PSEC0220、あるいは PSEC0242 等の発現の抑制が観察されるときには、アルツハイマー病と関連付けることができる。

本発明はまた、これら本発明のポリヌクレオチドの発現状態を明らかにするための試薬に関する。より具体的には、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 塩基の長さを持つポリヌクレオチドの、本発明のポリヌクレオチドの検出のための使用に関する。あるいは本発明は、本発明の蛋白質を認識する抗体の、この蛋白質の検出のための使用に関する。

発明を実施するための最良の形態

以下本発明を実施例として更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されるものではない。

実施例 1 アミロイド β 蛋白の凝集、沈着を促進または抑制するタンパク

質をコードする cDNA のクローニング

ヒト胎児精巣由来のテラトカルシノーマ細胞でレチノイン酸処理により神経細胞に分化可能な NT-2 神経前駆細胞 (stratagene 社より購入) を用いた。添付マニュアルに従って、次の条件で培養細胞を調製した。

(1) NT-2 細胞をレチノイン酸で誘導しないで培養 (NT2RM1)

(3) NT-2 細胞を培養後、レチノイン酸を添加して誘導後、2 週間培養 (NT2RP3)

これらの培養細胞をそれぞれ集めて、文献 (J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring harbor Laboratory Press 1989) 記載の方法により mRNA を抽出した。さらに、オリゴ dT セルロースで poly(A)⁺RNA を精製した。

同様に、ヒト胎盤組織 (PLACE1)、ヒト胎児より脳を多く含む組織 (HEMBA1) より、文献 (J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring harbor Laboratory Press, 1989) 記載の方法により mRNA を抽出した。さらに、オリゴ dT セルロースで poly(A)⁺RNA を精製した。

それぞれの poly(A)⁺RNA よりオリゴキャップ法 [M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994)] により cDNA ライブラリーを作成した。Oligo-cap linker (agcaucgagu cgccuuguu ggccuacugg / 配列番号: 11) およびオリゴ dT プライマー (gcggtgaag acggcctatg tggccttttttttttttttt / 配列番号: 12) を用いて文献 [鈴木・菅野, タンパク質 核酸 酵素, 41: 197-201 (1996)、Y. Suzuki et al., Gene, 200: 149-156 (1997)] の記載にしたがって BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco Acid Phosphatase) 処理、RNA ライゲーション、第一鎖 cDNA の合成と RNA の除去を行った。次いで、5' (agcatcgagt cggccttggt g / 配列番号: 13) と 3' (gcggtgaag acggcctatg t / 配列番号: 14) の PCR プ

ライマーを用い PCR (polymerase chain reaction) により 2 本鎖 cDNA に変換し、SfiI 切断した。次いで、DraIII で切断したベクター pUC19FL3 (NT2RM1) または pME18SFL3 (GenBank AB009864, Expression vector) (NT2RP3、PLACE1、HEMBA1) に cDNA の方向性を決めてクローニングし、cDNA ライブラリーを作成した。これらより得たクローンのプラスミド DNA について、NT2RM1、PLACE1、HEMBA1 については、挿入 cDNA サイズが 1 kb 以下のクローンを、また、NT2RP3 については、挿入 cDNA サイズが 2 kb 以下のクローンを除いた後、cDNA の 5' 端と 3' 端の塩基配列を DNA シーケンシング試薬 (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit または BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems 社製) を用い、マニュアルに従ってシーケンシング反応後、DNA シーケンサー (ABI PRISM 377, PE Biosystems 社製) で DNA 塩基配列を解析した。

NT2RM1 以外のオリゴキャップ高全長率 cDNA ライブラリーは、真核細胞での発現が可能な発現ベクター pME18SFL3 を用いて作製した。pME18SFL3 にはクローニング部位の上流に SR α プロモーターと SV40 small t イントロンが組み込まれており、またその下流には SV40 ポリ A 付加シグナル配列部位が挿入されている。pME18SFL3 のクローン化部位は非対称性の DraIII サイトとなっており、cDNA 断片の末端にはこれと相補的な SfiI 部位を付加しているので、クローン化した cDNA 断片は SR α プロモーターの下流に一方向性に挿入される。したがって、全長 cDNA を含むクローンでは、得られたプラスミドをそのまま COS 細胞に導入することにより、一過的に遺伝子を発現させることが可能である。すなわち、非常に容易に、遺伝子産物であるタンパク質として、あるいはそれらの生物学的活性として実験的に解析することが可能となっている。

オリゴキャップ法で作製したライブラリーの cDNA の 5'-末端の全長率を

次の方法で、求めた。公共データベース中のヒト既知 mRNA と 5'-末端配列が一致する全クローンについて、公共データベース中の既知 mRNA 配列より長く 5'-末端が伸びている場合と 5'-末端は短いが翻訳開始コドンは有している場合を「全長」と判断し、翻訳開始コドンを含んでいない場合を「非全長」と判断した。各ライブラリーでの cDNA クローンの 5'-末端の全長率 $[\text{全長クローン数} / (\text{全長クローン数} + \text{非全長クローン数})]$ をヒト既知 mRNA と比較することにより求めた (NT2RM1 : 69% ; NT2RP3 : 61% ; PLACE1 : 68% ; HEMBA1 : 53%)。この結果より、5'-端配列の全長率が非常に高いことが分かった。

cDNA ライブラリーとクローンとの関係は次のとおりである。

HEMBA1 : PSEC0220

NT2RM1 : PSEC0012

NT2RP3 : PSEC0242、PSEC0256

PLACE1 : PSEC0129

更にこうして選択したクローンについて、全長 cDNA の塩基配列、並びに推定アミノ酸配列を決定した。塩基配列は、次に示す 3 種の方法を組み合わせ、各方法によって決定した塩基配列を完全にオーバーラップさせ、最終的な確定塩基配列を決定した。

(1) Licor DNA シーケンサーを用いた cDNA 挿入断片両末端からのロングリードシーケンス (Licor シーケンサー (アロカ社販売) のマニュアルに従ってシーケンシング反応後、Licor シーケンサーで DNA 塩基配列を解析した)、

(2) AT2 トランスポゾン試験管内転移を用いた Primer Island 法によるネステッドシーケンス [S. E. Devine and J. D. Boeke, Nucleic Acids Res., 22: 3765-3772, (1994)] (PE Biosystems 社製のキットとマニュアルにしたがってクローンを取得後、PE Biosystems 社製の DNA シーケンシング試

薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)

(3) カスタム合成 DNA プライマーを用いたダイデオキシターミネーター法によるプライマーウォーキング(カスタム合成 DNA プライマーをもちい P E Biosystems 社製の DNA シーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)

得られた配列について、ATGpr [A. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. S windells, Bioinformatics, 14: 384-390 (1998); <http://www.hri.co.jp/atgpr/>]と PSORT による解析および GenBank や SwissProt に対する BLAST 解析を行った。これらの配列について、ATGpr と PSORT による解析および GenBank や SwissProt に対する BLAST 解析を行った。ほとんどのクローンが N-末端にシグナル配列をもつ分泌蛋白質、または膜蛋白質であると推定された。PSEC0242 と PSEC0256 は、PSORT でシグナル配列が検出されなかったが、SOSUI により transmembrane helix の存在が認められ、膜蛋白質であると推定された。以上の解析により、PSEC0012、PSEC0129、および PSEC0220 は、分泌蛋白質、または膜蛋白質で N-末端にシグナル配列が存在し、全長 cDNA クローンであると予測された。また PSEC0242 と PSEC0256 は、N-末端にシグナル配列は存在しないが膜蛋白質であり、全長 cDNA クローンであると予測された。なお PSEC242 は、3 番目の ATG から翻訳がはじまるとすると「N-末端にシグナル配列を見出すことができた。

PSEC0242: No.3 ATG, ATGpr1 0.82, SP-Yes, ORF 171-1343 391 aa, Signal peptide 24;

以上の結果を、次に示す。クローン名の後ろに//で区切って次のデータを記載した。

クローン名//

cDNA のサイズ//

推定アミノ酸配列の構成アミノ酸数//

N 末端から数えた ATG の数//

最大 ATGpr1 値//

シグナル配列の有無、あるいは PSORT によるシグナル配列の予測結果、MEM
STAT と SOSUI による膜蛋白質の予測結果//

アノテーション

PSEC0012//C-NT2RM1000853//1499//183//1//0.82//125/183 (68.3%) aa i
dentity to fugu putative protein 2 (PUT2).

PSEC0129//C-PLACE1004170//1828//135//1//0.94//1564/1615 (96%) simi
larity to human chromosome 16q13/21 BAC clone CIT987SK-A-152E5

PSEC0220//C-HEMBA1005301//1584//365//1//0.94//354/365 (96%) aa ide
ntity to mouse WNT-6 protein precursor; 1084/1310 (82%) similarity
to mouse Wnt-6 mRNA

PSEC0242//C-NT2RP3000266//3017//401//1//0.90//No & transmembrane//
242/242 (100%) simirality to human Newcastle disease virus inducib
le protein mRNA, partial 3' UTR region; 85/341 (24%) aa identity t
o human myosin heavy chain.

PSEC0256//C-NT2RP3003549//3520//612//1//0.89//No & transmembrane//
97/362 (26%) aa identity to rat cadherin-6 precursor; 1174/1394 (8
4%) similarity to mRNA for KIAA0345

実施例 5 アミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進するタンパク質の発
現

COS細胞 (600万cells / dish) を播種し、実施例 1 で得られた発現プラ
スミド (10 μ g) を LIPOFECTAMINE (Gibco BRL 社製) (10 μ l) とともに加え、
COS7細胞に遺伝子を導入した。この様にして作製された当該遺伝子を発現

する組換え細胞をD-MEM, 10% FCS, Pc. Sm. (+)培地により3日間培養を行った。培養後培養上清を上清画分として回収した。

実施例6 アミロイド β の凝集反応

アミロイド β 蛋白の凝集を促進または抑制するタンパク質を、実施例5記載の上清を用いてスクリーニングを行った。試験は基本的に Methods in Enzymology Volume 309(1999) p 274-284 に記載の方法に従った。アミロイド β 蛋白は、生体内で通常存在するA β 40及びA β 42を用いる代わりに同様の凝集能を有するとされるA β のN末端から28残基までのA β 1-28を用いて試験を行った。下記の様な実験を行い108クローンから凝集促進作用または抑制作用の強い5クローンを選択した。試験方法および選択した5クローンの活性を以下に示した。

(試験方法) 1 mMの合成 A β 1-28 (Bachem 社) 3 μ l に上記実施例2に記載の発現上清 17 μ l を添加し、300 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.2) 10 μ l を加え反応を開始させた。24時間後、反応サンプル 5 μ l に 10 μ M thioflavin-T (in 50mM potassium phosphate) 200 μ l を加えた。凝集したA β を蛍光強度を測定 (excitation 450 nm, emission 482 nm) することにより求めた。対照は発現上清の代わりに合成A β 40-1 (A β 40の逆配列ペプチド) を 100 μ Mになるように加えた。結果は、A β 40-1の添加によるA β 1-28の凝集による蛍光強度100%として、その相対的な蛍光強度を下表に示した。

表1. A β 40-1の添加によるA β 1-28の凝集による蛍光強度変化

タンパク質	蛍光強度
PSEC0012(配列1のクローンの発現上清)	24%
PSEC0129(配列3のクローンの発現上清)	24%
PSEC0220(配列5のクローンの発現上清)	250%
PSEC0242(配列7のクローンの発現上清)	16%
PSEC0256(配列9のクローンの発現上清)	460%

配列表の配列番号 1、3、7 のポリヌクレオチドを含むクローンの発現したタンパク質は、アミロイド β 蛋白の凝集を抑制し、配列表の配列番号 5、9 のポリヌクレオチドを含むクローンの発現したタンパク質は、アミロイド β 蛋白の凝集を促進した。

さらに、Congo Red で染色して凝集した合成 A β の沈着を顕鏡下による目視で確認した。

実施例 6 アルツハイマー病患者での遺伝子発現解析

正常人とアルツハイマー患者での該遺伝子の発現量を比較した。それぞれのクローンについて下記のプライマーを作成して、海馬 cDNA を template にして定量的 PCR により行った。アルツハイマー患者（60 歳）の海馬 cDNA（No. 0550903）と正常人（28 歳）の海馬 cDNA（No. 0510069）は BioChain Institute Inc. より購入して使用した。発現量を解析は、PE Applied Biosystems 社の PRISM 7700 を使用し、SYBR Green を用いた定量的 PCR のプロトコール（P/N 4304965）に従って行った。PCR に用いたプライマーは、次の 4 セットである。

PSEC012-894F:GTGGATGCGATCTGTCTCTCC（配列番号：15）

PSEC012-1049R:TGCAGAAAGGAACACATGCTG（配列番号：16）

PSEC129-190F:CTCCATGCTTCAGCTGTGG（配列番号：17）

PSEC129-340R:GCCCTGGTCTGTATACCTGGG（配列番号：18）

PSEC242-599F:CTACGACCTGAGCCAGTGCA（配列番号：19）

PSEC242-749R:GAGGGCTTGGAGCTGCTGT（配列番号：20）

PSEC256-1502F:GCATTCTACGGGCTGGTCC（配列番号：21）

PSEC256-1652R:GGGTTGCCTGGTCCGTATT（配列番号：22）

アルツハイマー患者での発現量は、正常人に比べて、PSEC012 では 1/2、PSEC129 では 1/10、PSEC242 では 1/9 に減少していた。逆に、PSEC256

では、アルツハイマー患者での発現量は 1.5 倍に上昇していた。

産業上の利用の可能性

本発明により、アミロイド β 蛋白の凝集、沈着を抑制または促進するタンパク質およびそれをコードするポリヌクレオチドが提供された。本発明のタンパク質およびそれをコードするポリヌクレオチドは、アルツハイマー病を含む疾患の治療や予防のための医薬として、またこれら疾患の診断に有用である。また、本発明によりアミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進する化合物のスクリーニングが可能となった。本発明のスクリーニングにより、アミロイド β の凝集を抑制する有効なアルツハイマー治療薬が開発されることが期待される。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (e) のいずれかに記載のアミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(a) 配列番号：1, 3, 5, 7, および 9 のいずれかに記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(b) 配列番号：2, 4, 6, 8, および 10 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号：2, 4, 6, 8, および 10 のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号：1, 3, 5, 7, および 9 のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号：1, 3, 5, 7, および 9 のいずれかに記載の塩基配列において、少なくとも (1) 60% のホモロジー、(2) 70% のホモロジー、(3) 80% のホモロジー、(4) 90% のホモロジー、または (5) 95% のホモロジーを有するポリヌクレオチド、

2. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド。

3. 請求項 1 および請求項 2 のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされるペプチドまたはタンパク質。

4. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドと分子進化上、同一の遺伝子を起源とするポリヌクレオチドによってコードされる、アミロイド β 蛋白の凝集を抑制または促進するタンパク質。

5. 請求項 1 および請求項 2 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
6. 請求項 1 および請求項 2 のいずれかに記載のポリヌクレオチド、または請求項 5 に記載のベクターを保持する形質転換体。
7. 請求項 6 に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、請求項 3 に記載のペプチドまたはタンパク質の製造方法。
8. 請求項 1 および請求項 2 のいずれかに記載のポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなる少なくとも 15 塩基の長さを有するポリヌクレオチド。
9. 請求項 3 に記載のペプチドまたはタンパク質に対する抗体。
10. 請求項 3 に記載のペプチドまたはタンパク質と請求項 9 に記載の抗体の免疫学的な反応を観察する工程を含む、免疫学的測定方法。
11. アミロイド β 蛋白の存在下、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質または該タンパク質を発現する細胞に候補化合物を接触させ、アミロイド β 蛋白の凝集または沈着を調節する候補化合物を選択することを特徴とする、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の活性を制御する化合物をスクリーニングする方法。
12. 次の工程を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の発現を制御する化合物をスクリーニングする方法。
 - (1) 配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、および配列番号：9 から選択されるいずれかに記載の塩基配列からなる遺伝子の発現制御領域と、その下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、
 - (2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、および

(3) 対照と比較して、工程(2)におけるレポーター活性を増加または減少させる候補物質を選択する工程

1 3. 請求項 1 1 および請求項 1 2 のいずれかに記載の方法で得ることができる化合物を含有する医薬。

1 4. 請求項 3 および請求項 4 のいずれかに記載のペプチドまたはタンパク質を含有する医薬。

1 5. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドのタンパク質コード配列に対するアンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬。

1 6. アルツハイマー病の予防剤または治療剤である、請求項 1 3 および請求項 1 4 のいずれかに記載の医薬。

1 7. 次の工程を含む、アルツハイマー病の検出方法。

(1) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの発現状態を測定する工程、

(2) (1) の測定結果を正常な状態における前記ポリヌクレオチドの発現状態と比較する工程、

(3) 比較の結果、前記ポリヌクレオチドの発現状態の変化をアルツハイマー病と関連付ける工程

SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute

<120> Amyloid Beta Agligation Regulatry Factor

<130> H1-106PCT2

<140>

<141>

<150> JP 1999-194179

<151> 1999-07-08

<150> US 60/159586

<151> 1999-10-18

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1499

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (58)..(606)

<400> 1

```

cgggctgcag cgggcttgta ggtgtccggc tttgctggcc cagcaagcct gataagc      57
atg aag ctc tta tct ttg gtg gcc gtg gtc ggg tgt ttg ctg gtg ccc      105
Met Lys Leu Leu Ser Leu Val Ala Val Val Gly Cys Leu Leu Val Pro
  1             5             10             15

cca gct gaa gcc aac aag agt tct gaa gat atc cgg tgc aaa tgc atc      153
Pro Ala Glu Ala Asn Lys Ser Ser Glu Asp Ile Arg Cys Lys Cys Ile
      20             25             30

tgt cca cct tat aga aac atc agt ggg cat att tac aac cag aat gta      201
Cys Pro Pro Tyr Arg Asn Ile Ser Gly His Ile Tyr Asn Gln Asn Val
      35             40             45

tcc cag aag gac tgc aac tgc ctg cac gtg gtg gag ccc atg cca gtg      249
Ser Gln Lys Asp Cys Asn Cys Leu His Val Val Glu Pro Met Pro Val
      50             55             60

```



```

cct ggc cat gac gtg gag gcc tac tgc ctg ctg tgc gag tgc agg tac 297
Pro Gly His Asp Val Glu Ala Tyr Cys Leu Leu Cys Glu Cys Arg Tyr
65 70 75 80

gag gag cgc agc acc acc acc atc aag gtc atc att gtc atc tac ctg 345
Glu Glu Arg Ser Thr Thr Thr Ile Lys Val Ile Ile Val Ile Tyr Leu
85 90 95

tcc gtg gtg ggt gcc ctg ttg ctc tac atg gcc ttc ctg atg ctg gtg 393
Ser Val Val Gly Ala Leu Leu Leu Tyr Met Ala Phe Leu Met Leu Val
100 105 110

gac cct ctg atc cga aag ccg gat gca tac act gag caa ctg cac aat 441
Asp Pro Leu Ile Arg Lys Pro Asp Ala Tyr Thr Glu Gln Leu His Asn
115 120 125

gag gag gag aat gag gat gct cgc tct atg gca gca gct gct gca tcc 489
Glu Glu Glu Asn Glu Asp Ala Arg Ser Met Ala Ala Ala Ala Ala Ser
130 135 140

ctc ggg gga ccc cga gca aac aca gtc ctg gag cgt gtg gaa ggt gcc 537
Leu Gly Gly Pro Arg Ala Asn Thr Val Leu Glu Arg Val Glu Gly Ala
145 150 155 160

cag cag cgg tgg aag ctg cag gtg cag gag cag cgg aag aca gtc ttc 585
Gln Gln Arg Trp Lys Leu Gln Val Gln Glu Gln Arg Lys Thr Val Phe
165 170 175

gat cgg cac aag atg ctc agc tagatgggct ggtgtggttg ggtcaaggcc 636
Asp Arg His Lys Met Leu Ser
180

ccaacaccat ggctgccagc ttccaggctg gacaaagcag ggggctactt ctcccttccc 696

tcggttccag tcttcccttt aaaagcctgt ggcatttttc ctcccttctcc ctaacttttag 756

aaatgttgta cttggctatt ttgattaggg aagagggatg tggctctga tctctgttgt 816

cttcttgggt ctttgggggt gaagggatgg ggaaggcagg ccagaaggga atggagacat 876

tcgaggcggc ctcaggagtg gatgcatct gtctctcttg gctccactct tgccgccttc 936

cagctctgag tcttgggaat gttgtttacc ttggaagata aagctgggtc ttcaggaact 996

cagtgtctgg gaggaagca tggcccagca ttcagcatgt gttcctttct gcagtgggtc 1056

ttatcaccac ctccctccca gcccagcgc ctcagcccca gcccagctc cagccctgag 1116

```


gacagctctg atgggagagc tgggccccct gagcccactg ggtcttcagg gtgcactgga 1176
 agctgggtgtt cgctgtcccc tgtgcacttc tcgcactggg gcatggagtg cccatgcata 1236
 ctctgtctgcc ggtccccctca cctgcacttg aggggtctgg gcagtcctc ctctcccag 1296
 tgtccacagt cactgagcca gacggtcggt tggaacatga gactcgaggc tgagcgtgga 1356
 tctgaacacc acagcccctg tacttgggtt gcctctgtc cctgaacttc gttgtaccag 1416
 tgcatggaga gaaaattttg tcctctgtc ttagagttgt gtgtaaatca aggaagccat 1476
 cattaaattg ttttatttct ctc 1499

<210> 2

<211> 183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Lys	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ala	Val	Val	Gly	Cys	Leu	Leu	Val	Pro
1				5					10					15	
Pro	Ala	Glu	Ala	Asn	Lys	Ser	Ser	Glu	Asp	Ile	Arg	Cys	Lys	Cys	Ile
			20					25					30		
Cys	Pro	Pro	Tyr	Arg	Asn	Ile	Ser	Gly	His	Ile	Tyr	Asn	Gln	Asn	Val
		35					40					45			
Ser	Gln	Lys	Asp	Cys	Asn	Cys	Leu	His	Val	Val	Glu	Pro	Met	Pro	Val
		50				55					60				
Pro	Gly	His	Asp	Val	Glu	Ala	Tyr	Cys	Leu	Leu	Cys	Glu	Cys	Arg	Tyr
65					70				75					80	
Glu	Glu	Arg	Ser	Thr	Thr	Thr	Ile	Lys	Val	Ile	Ile	Val	Ile	Tyr	Leu
				85					90					95	
Ser	Val	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Tyr	Met	Ala	Phe	Leu	Met	Leu	Val
			100					105					110		
Asp	Pro	Leu	Ile	Arg	Lys	Pro	Asp	Ala	Tyr	Thr	Glu	Gln	Leu	His	Asn
		115					120					125			
Glu	Glu	Glu	Asn	Glu	Asp	Ala	Arg	Ser	Met	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser
130						135						140			

Leu Gly Gly Pro Arg Ala Asn Thr Val Leu Glu Arg Val Glu Gly Ala
145 150 155 160

Gln Gln Arg Trp Lys Leu Gln Val Gln Glu Gln Arg Lys Thr Val Phe
165 170 175

Asp Arg His Lys Met Leu Ser
180

<210> 3
<211> 1828
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (83)..(487)

<400> 3
aagcgacgac ttccgccctc cttagggccg tgggtcccgta gctaccggtc gcgtcgccgt 60
gggcgacgtg cccgcttcca aa atg gcg gcg gcg gcg gta tct ggt gcg ctt 112
Met Ala Ala Ala Ala Val Ser Gly Ala Leu
1 5 10
ggc cgg gcg ggc tgg agg ctc ctg cag ctg cga tgc ctg ccc gtg gcc 160
Gly Arg Ala Gly Trp Arg Leu Leu Gln Leu Arg Cys Leu Pro Val Ala
15 20 25
cgt tgc cga caa gcc ctg gtg ccg cgt gcc ttc cat gct tca gct gtg 208
Arg Cys Arg Gln Ala Leu Val Pro Arg Ala Phe His Ala Ser Ala Val
30 35 40
ggg cta agg tct tca gat gag cag aag cag cag cct ccc aac tca ttt 256
Gly Leu Arg Ser Ser Asp Glu Gln Lys Gln Gln Pro Pro Asn Ser Phe
45 50 55
tct cag cag cat tct gag aca cag ggc gca gaa aaa cct gat cca gag 304
Ser Gln Gln His Ser Glu Thr Gln Gly Ala Glu Lys Pro Asp Pro Glu
60 65 70
tct tct cat tca ccc ccc agg tat aca gac cag ggc ggc gag gag gag 352
Ser Ser His Ser Pro Pro Arg Tyr Thr Asp Gln Gly Gly Glu Glu Glu
75 80 85 90
gag gac tat gaa agt gag gag cag ttg cag cac cgc atc ctg acg gca 400

Glu Asp Tyr	Glu Ser Glu	Glu Gln Leu	Gln His Arg	Ile Leu Thr	Ala	
	95		100		105	

gcc ctt gag ttt gtg ccc gcc cac ggg tgg aca gca gag gcg att gca 448
 Ala Leu Glu Phe Val Pro Ala His Gly Trp Thr Ala Glu Ala Ile Ala
 110 115 120

gaa gga gcc cag gtg tgt ata ggt gag ggt ggg gcc acc taaccaagat 497
 Glu Gly Ala Gln Val Cys Ile Gly Glu Gly Gly Ala Thr
 125 130 135

gagccaggat ggagtcacac caggcagagc ggggggcctc atgccttctt ccagtctagc 557
 tcagagcccc tcacagctgc aagattgact ggittitiic cccaatagg gtggaactgg 617
 ctttattttg tagttataaa gaacatacca tggagttggt tcttgggagt tgtgttctaa 677
 aggcaatcta ttaggcaaga attgtctgtg atcaaaactc ccatgtttca ttgactctaa 737
 gatgccattg gttgtaagaa gcatcatttt taaatgcac agtaaaaaag aaaacatact 797
 gcccttcgaa ctatgacaaa gcacttctgt gattcacact gattttttaa aatgaaaaat 857
 atatctgcat cttagaatta atgacatatg gtgtttgaaa accccaaga aggcaccact 917
 ttggagacca acacatctta ttttcccaga aactctaata gcattttctg cattagtaca 977
 gactgctgct ttagattagg cagcaggctc atgttcaggc catgtttagt agaatcctcc 1037
 agcatagcaa gataccatcc tccaagagac tgaggggatg acagagtgc atcttccatc 1097
 ccaggcttgc tgcaggcat ctacccatgg acaatgggca aggttgctgc tttactgaaa 1157
 ttttaactgtt atttccittgt cttctctcac tccaagtgc acatttggtta acagaagtct 1217
 cattagttaa atgtgggtgc tctgactcca ctgtaggctc attgtgaaaa ctgaacaata 1277
 caaacaata taaaaaagaa ttagaaaaac acctataatc acaccaaaga tcatactatc 1337
 aacatttatg cctagatctt tccaattaaa accctttata tgattcattc tttaaatgtt 1397
 tattgagcaa ataattgtcc ctaggcactg tgctagtcca agagacatga caggggtcaa 1457
 agtgggtcaag atggatctgc ttcttgcct tgttgagctt ccagtctagc aacattaata 1517
 aaatatatac aaatgtttac ttagaagatg tggttaagtgc tatcaaggaa aggtgctgtt 1577
 gggctgtata atggaggagc ccgatcatta gatcaggta cagctgcgag attgactggt 1637

ttctttccct caataggggtg gaaatggctt tattttgtgg atataaaagt aatgaaccat 1697
 ggaattgggtt cttgagagtt gtgttctaaa ggcaacctat tggcaagaat tgtctgtgat 1757
 caaaactacc atatttcatt gactctaaga tgccattggg tgtaagaagc actatttitta 1817
 agtacatcag t 1828

<210> 4
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Ala Ala Ala Val Ser Gly Ala Leu Gly Arg Ala Gly Trp Arg
 1 5 10 15
 Leu Leu Gln Leu Arg Cys Leu Pro Val Ala Arg Cys Arg Gln Ala Leu
 20 25 30
 Val Pro Arg Ala Phe His Ala Ser Ala Val Gly Leu Arg Ser Ser Asp
 35 40 45
 Glu Gln Lys Gln Gln Pro Pro Asn Ser Phe Ser Gln Gln His Ser Glu
 50 55 60
 Thr Gln Gly Ala Glu Lys Pro Asp Pro Glu Ser Ser His Ser Pro Pro
 65 70 75 80
 Arg Tyr Thr Asp Gln Gly Gly Glu Glu Glu Glu Asp Tyr Glu Ser Glu
 85 90 95
 Glu Gln Leu Gln His Arg Ile Leu Thr Ala Ala Leu Glu Phe Val Pro
 100 105 110
 Ala His Gly Trp Thr Ala Glu Ala Ile Ala Glu Gly Ala Gln Val Cys
 115 120 125
 Ile Gly Glu Gly Gly Ala Thr
 130 135

<210> 5
 <211> 1584
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

$\langle 220 \rangle$
 $\langle 221 \rangle$ CDS
 $\langle 222 \rangle$ (100) .. (1194)

ggc acc ccc gga ccc cct ggc ccc gcg ggc tcc ccg gaa ggc agc gcc	594
Gly Thr Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ser Pro Glu Gly Ser Ala	
150 155 160 165	
gcc tgg gag tgg gga ggc tgc ggc gac gac gtg gac ttc ggg gac gag	642
Ala Trp Glu Trp Gly Gly Cys Gly Asp Asp Val Asp Phe Gly Asp Glu	
170 175 180	
aag tcg agg ctc ttt atg gac gcg cgg cac aag ccg gga cgc gga gac	690
Lys Ser Arg Leu Phe Met Asp Ala Arg His Lys Arg Gly Arg Gly Asp	
185 190 195	
atc cgc gcg ttg gtg caa ctg cac aac aac gag gcg ggc agg ctg gcc	738
Ile Arg Ala Leu Val Gln Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Leu Ala	
200 205 210	
gtg cgg agc cac acg cgc acc gag tgc aaa tgc cac ggg ctg tcg gga	786
Val Arg Ser His Thr Arg Thr Glu Cys Lys Cys His Gly Leu Ser Gly	
215 220 225	
tca tgc gcg ctg cgc acc tgc tgg cag aag ctg cct cca ttt cgc gag	834
Ser Cys Ala Leu Arg Thr Cys Trp Gln Lys Leu Pro Pro Phe Arg Glu	
230 235 240 245	
gtg ggc gcg cgg ctg ctg gag cgc ttc cac ggc gcc tca cgc gtc atg	882
Val Gly Ala Arg Leu Leu Glu Arg Phe His Gly Ala Ser Arg Val Met	
250 255 260	
ggc acc aac gac ggc aag gcc ctg ctg ccc gcc gtc cgc acg ctc aag	930
Gly Thr Asn Asp Gly Lys Ala Leu Leu Pro Ala Val Arg Thr Leu Lys	
265 270 275	
ccg ccg ggc cga gcg gac ctc ctc tac gcc gcc gat tcg ccc gac ttc	978
Pro Pro Gly Arg Ala Asp Leu Leu Tyr Ala Ala Asp Ser Pro Asp Phe	
280 285 290	
tgc gcc ccc aac cga cgc acc ggc tcc ccc ggc acg cgc ggt cgc gcc	1026
Cys Ala Pro Asn Arg Arg Thr Gly Ser Pro Gly Thr Arg Gly Arg Ala	
295 300 305	
tgc aat agc agc gcc ccg gac ctc agc ggc tgc gac ctg ctg tgc tgc	1074
Cys Asn Ser Ser Ala Pro Asp Leu Ser Gly Cys Asp Leu Leu Cys Cys	
310 315 320 325	
ggc cgc ggg cac cgc cag gag agc gtg cag ctc gaa gag aac tgc ctg	1122
Gly Arg Gly His Arg Gln Glu Ser Val Gln Leu Glu Glu Asn Cys Leu	
330 335 340	

tgc cgc ttc cac tgg tgc tgc gta gta cag tgc cac cgc tgc cgt gtg 1170
 Cys Arg Phe His Trp Cys Cys Val Val Gln Cys His Arg Cys Arg Val
 345 350 355

cgc aag gag ctc agc ctc tgc ctg tgacccgccg cccggccgct agactgactt 1224
 Arg Lys Glu Leu Ser Leu Cys Leu
 360 365

cgcgcagcgg tggctcgcac ctgtgggacc tcagggcacc ggcaccgggc gcctctcgcc 1284
 gctcgagccc agcctctccc tgccaaagcc caactcccag ggctctggaa atggtgaggc 1344
 gaggggcttg agaggaacgc ccaccacga aggcccaggg cgccagacgg ccccgaaaag 1404
 gcgctcgggg agcgttttaa ggacactgta caggccctcc ctccccttgg cctctaggag 1464
 gaaacagttt tttagactgg aaaaaagcca gtctaaaggc ctctggatac tgggctcccc 1524
 agaactgctg gccacaggat ggtgggtgag gttagtatca ataaagatat ttaaaccacc 1584

<210> 6
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Leu Pro Pro Leu Pro Ser Arg Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Ala His Val Gly Gly Leu Trp Trp Ala Val Gly Ser Pro
 20 25 30
 Leu Val Met Asp Pro Thr Ser Ile Cys Arg Lys Ala Arg Arg Leu Ala
 35 40 45
 Gly Arg Gln Ala Glu Leu Cys Gln Ala Glu Pro Glu Val Val Ala Glu
 50 55 60
 Leu Ala Arg Gly Ala Arg Leu Gly Val Arg Glu Cys Gln Phe Gln Phe
 65 70 75 80
 Arg Phe Arg Arg Trp Asn Cys Ser Ser His Ser Lys Ala Phe Gly Arg
 85 90 95
 Ile Leu Gln Gln Asp Ile Arg Glu Thr Ala Phe Val Phe Ala Ile Thr
 100 105 110

Ala Ala Gly Ala Ser His Ala Val Thr Gln Ala Cys Ser Met Gly Glu
 115 120 125
 Leu Leu Gln Cys Gly Cys Gln Ala Pro Arg Trp Arg Ala Pro Pro Arg
 130 135 140
 Pro Ser Gly Leu Pro Gly Thr Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ser
 145 150 155 160
 Pro Glu Gly Ser Ala Ala Trp Glu Trp Gly Gly Cys Gly Asp Asp Val
 165 170 175
 Asp Phe Gly Asp Glu Lys Ser Arg Leu Phe Met Asp Ala Arg His Lys
 180 185 190
 Arg Gly Arg Gly Asp Ile Arg Ala Leu Val Gln Leu His Asn Asn Glu
 195 200 205
 Ala Gly Arg Leu Ala Val Arg Ser His Thr Arg Thr Glu Cys Lys Cys
 210 215 220
 His Gly Leu Ser Gly Ser Cys Ala Leu Arg Thr Cys Trp Gln Lys Leu
 225 230 235 240
 Pro Pro Phe Arg Glu Val Gly Ala Arg Leu Leu Glu Arg Phe His Gly
 245 250 255
 Ala Ser Arg Val Met Gly Thr Asn Asp Gly Lys Ala Leu Leu Pro Ala
 260 265 270
 Val Arg Thr Leu Lys Pro Pro Gly Arg Ala Asp Leu Leu Tyr Ala Ala
 275 280 285
 Asp Ser Pro Asp Phe Cys Ala Pro Asn Arg Arg Thr Gly Ser Pro Gly
 290 295 300
 Thr Arg Gly Arg Ala Cys Asn Ser Ser Ala Pro Asp Leu Ser Gly Cys
 305 310 315 320
 Asp Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Arg Gln Glu Ser Val Gln Leu
 325 330 335
 Glu Glu Asn Cys Leu Cys Arg Phe His Trp Cys Cys Val Val Gln Cys
 340 345 350
 His Arg Cys Arg Val Arg Lys Glu Leu Ser Leu Cys Leu
 355 360 365



<210> 7
 <211> 3017
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (141)..(1343)

<400> 7																
gctgggcgca	cggcgcggag	ccggccggag	ctcgaggccg	gcggcggcgg	gagagcgacc	60										
cgggcggcct	cgtagcgggg	ccccggatcc	ccgagtggcg	gccggagcct	cgaaaagaga	120										
ttctcagcgc	tgattttgag	atg	atg	ggc	ttg	gga	aac	ggg	cgt	cgc	agc	atg	173			
		Met	Met	Gly	Leu	Gly	Asn	Gly	Arg	Arg	Ser	Met				
		1				5					10					
aag	tcg	cgc	ccc	ctc	gtg	ctg	gcc	gcc	ctg	gtg	gcc	tcg	atc	atc	gtc	221
Lys	Ser	Pro	Pro	Leu	Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Cys	Ile	Ile	Val	
			15					20					25			
ttg	ggc	ttc	aac	tac	tgg	att	gcg	agc	tcc	cgg	agc	gtg	gac	ctc	cag	269
Leu	Gly	Phe	Asn	Tyr	Trp	Ile	Ala	Ser	Ser	Arg	Ser	Val	Asp	Leu	Gln	
		30					35					40				
aca	cgg	atc	atg	gag	ctg	gaa	ggc	agg	gtc	cgc	agg	gcg	gct	gca	gag	317
Thr	Arg	Ile	Met	Glu	Leu	Glu	Gly	Arg	Val	Arg	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	
		45				50					55					
aga	ggc	gcc	gtg	gag	ctg	aag	aag	aac	gag	ttc	cag	gga	gag	ctg	gag	365
Arg	Gly	Ala	Val	Glu	Leu	Lys	Lys	Asn	Glu	Phe	Gln	Gly	Glu	Leu	Glu	
	60				65				70					75		
aag	cag	cgg	gag	cag	ctt	gac	aaa	atc	cag	tcc	agc	cac	aac	ttc	cag	413
Lys	Gln	Arg	Glu	Gln	Leu	Asp	Lys	Ile	Gln	Ser	Ser	His	Asn	Phe	Gln	
			80						85					90		
ctg	gag	agc	gtc	aac	aag	ctg	tac	cag	gac	gaa	aag	gcg	gtt	ttg	gtg	461
Leu	Glu	Ser	Val	Asn	Lys	Leu	Tyr	Gln	Asp	Glu	Lys	Ala	Val	Leu	Val	
			95					100					105			
aat	aac	atc	acc	aca	ggt	gag	agg	ctc	atc	cga	gtg	ctg	caa	gac	cag	509
Asn	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Glu	Arg	Leu	Ile	Arg	Val	Leu	Gln	Asp	Gln	
		110					115					120				
tta	aag	acc	ctg	cag	agg	aat	tac	ggc	agg	ctg	cag	cag	gat	gtc	ctc	557

Leu	Lys	Thr	Leu	Gln	Arg	Asn	Tyr	Gly	Arg	Leu	Gln	Gln	Asp	Val	Leu	
125						130					135					
cag	ttt	cag	aag	aac	cag	acc	aac	ctg	gag	agg	aag	ttc	tcc	tac	gac	605
Gln	Phe	Gln	Lys	Asn	Gln	Thr	Asn	Leu	Glu	Arg	Lys	Phe	Ser	Tyr	Asp	
140					145				150						155	
ctg	agc	cag	tgc	atc	aat	cag	atg	aag	gag	gtg	aag	gaa	cag	tgt	gag	653
Leu	Ser	Gln	Cys	Ile	Asn	Gln	Met	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Gln	Cys	Glu	
				160					165					170		
gag	cga	ata	gaa	gag	gtc	acc	aaa	aag	ggg	aat	gaa	gct	gta	gct	tcc	701
Glu	Arg	Ile	Glu	Glu	Val	Thr	Lys	Lys	Gly	Asn	Glu	Ala	Val	Ala	Ser	
			175					180					185			
aga	gac	ctg	agt	gaa	aac	aac	gac	cag	aga	cag	cag	ctc	caa	gcc	ctc	749
Arg	Asp	Leu	Ser	Glu	Asn	Asn	Asp	Gln	Arg	Gln	Gln	Leu	Gln	Ala	Leu	
		190					195					200				
agt	gag	cct	cag	ccc	agg	ctg	cag	gca	gca	ggc	ctg	cca	cac	aca	gag	797
Ser	Glu	Pro	Gln	Pro	Arg	Leu	Gln	Ala	Ala	Gly	Leu	Pro	His	Thr	Glu	
	205					210					215					
gtg	cca	caa	ggg	aag	gga	aac	gtg	ctt	ggt	aac	agc	aag	tcc	cag	aca	845
Val	Pro	Gln	Gly	Lys	Gly	Asn	Val	Leu	Gly	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Thr	
220					225					230					235	
cca	gcc	ccc	agt	tcc	gaa	gtg	gtt	ttg	gat	tca	aag	aga	caa	gtt	gag	893
Pro	Ala	Pro	Ser	Ser	Glu	Val	Val	Leu	Asp	Ser	Lys	Arg	Gln	Val	Glu	
				240					245					250		
aaa	gag	gaa	acc	aat	gag	atc	cag	gtg	gtg	aat	gag	gag	cct	cag	agg	941
Lys	Glu	Glu	Thr	Asn	Glu	Ile	Gln	Val	Val	Asn	Glu	Glu	Pro	Gln	Arg	
			255					260					265			
gac	agg	ctg	ccg	cag	gag	cca	ggc	cgg	gag	cag	gtg	gtg	gaa	gac	aga	989
Asp	Arg	Leu	Pro	Gln	Glu	Pro	Gly	Arg	Glu	Gln	Val	Val	Glu	Asp	Arg	
		270					275					280				
cct	gta	ggt	gga	aga	ggc	ttc	ggg	gga	gcc	gga	gaa	ctg	ggc	cag	acc	1037
Pro	Val	Gly	Gly	Arg	Gly	Phe	Gly	Gly	Ala	Gly	Glu	Leu	Gly	Gln	Thr	
	285					290					295					
cca	cag	gtg	cag	gct	gcc	ctg	tca	gtg	agc	cag	gaa	aat	cca	gag	atg	1085
Pro	Gln	Val	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Val	Ser	Gln	Glu	Asn	Pro	Glu	Met	
300					305					310					315	
gag	ggc	cct	gag	cga	gac	cag	ctt	gtc	atc	ccc	gac	gga	cag	gag	gag	1133

Glu Gly Pro Glu Arg Asp Gln Leu Val Ile Pro Asp Gly Gln Glu Glu
 320 325 330
 gag cag gaa gct gcc ggg gaa ggg aga aac cag cag aaa ctg aga gga 1181
 Glu Gln Glu Ala Ala Gly Glu Gly Arg Asn Gln Gln Lys Leu Arg Gly
 335 340 345
 gaa gat gac tac aac atg gat gaa aat gaa gca gaa tct gag aca gac 1229
 Glu Asp Asp Tyr Asn Met Asp Glu Asn Glu Ala Glu Ser Glu Thr Asp
 350 355 360
 aag caa gca gcc ctg gca ggg aat gac aga aac ata gat gtt ttt aat 1277
 Lys Gln Ala Ala Leu Ala Gly Asn Asp Arg Asn Ile Asp Val Phe Asn
 365 370 375
 gtt gaa gat cag aaa aga gac acc ata aat tta ctt gat cag cgt gaa 1325
 Val Glu Asp Gln Lys Arg Asp Thr Ile Asn Leu Leu Asp Gln Arg Glu
 380 385 390 395
 aag cgg aat cat aca ctc tgaattgaac tggaatcaca tatttcacaa 1373
 Lys Arg Asn His Thr Leu
 400
 cagggccgaa gagatgactt taaaatgttc atgagggact gaatactgaa aactgtgaaa 1433
 tgtactaaat aaaatgtaca tctgaagatg attattgtga aatttttagta tgcactttgt 1493
 gtaggaaaaa atggaatggc cttttaaaca gcttttgggg ggtactttgg aagtgtctaa 1553
 taagggtgtca caatttttgg tagtaggtat ttcgtgagaa gctcaacacc aaaactggaa 1613
 catagttctc ctccaagtgt tggcgacagc ggggcttcct gattctggaa tataactttg 1673
 tgtaaattaa cagccaccta tagaagagtc catctgtctg gaaggagaga cagagaactc 1733
 tgggttcctg cgtcctgtcc acgtgctgta ccaagtgtg gtgccagcct gttacctgtt 1793
 ctcaactgaaa agtctggcta atgctcttgt gtagtcactt ctgattctga caatcaatca 1853
 atcaatggcc tagagcactg actgttaaca caaacgtcac tagcaaagta gcaacagctt 1913
 taagtctaaa tacaaagctg ttctgtgtga gaatttttta aaaggctact tgtataataa 1973
 cccttgtcat ttttaatgta caaaacgcta ttaagtggct tagaatttga acatttgtgg 2033
 tctttattta ctttgcttcg tgtgtgggca aagcaacatc ttccctaaat atatattacc 2093
 aagaaaagca agaagcagat taggtttttg acaaaaacaaa caggccaaaa gggggctgac 2153

ctggagcaga gcatggtgag aggcaaggca tgagagggca agttttgttg tggacagatc 2213
 tgtgcctact ttattactgg agtaaaagaa aacaaagttc attgatgtcg aaggatatac 2273
 acagtgtag aaattaggac tgtttagaaa aacaggaata caatggttgt ttttatcata 2333
 gtgtacacat ttagcttggt gtaaatgact cacaaaactg attttaaaat caagttaatg 2393
 tgaattttga aaattactac ttaatcctaa ttcacaataa caatggcatt aaggtttgac 2453
 ttgagttggt tcttagtatt atttatggta aataggctct taccacttgc aaataactgg 2513
 ccacatcatt aatgactgac ttcccagtaa ggciciciaa ggggtaagia ggaggatcca 2573
 caggatttga gatgctaagg cccagagat cgtttgaacc aaccctctta ttticagagg 2633
 ggaaaatggg gcctagaagt tacagagcat ctagctgggt cgctggcacc cctggcctca 2693
 cacagactcc cgagtagctg ggactacagg cacacagtca ctgaagcagg cctgttttgc 2753
 aattcacgct gccacctcca acttaaacat tcttcatatg tgatgtcctt agtcactaag 2813
 gttaaacttt cccaccaga aaaggcaact tagataaaat cttagagtac tttcatactc 2873
 ttctaagtcc tcttcagcc tcactttgag tcctccttgg ggttgatagg aattttctct 2933
 tgctttctca ataaagtctc tattcatctc atgtttaatt tgtacgcata gaattgctga 2993
 gaaataaaat gttctgttca actt 3017

<210> 8
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Met Met Gly Leu Gly Asn Gly Arg Arg Ser Met Lys Ser Pro Pro Leu
 1 5 10 15
 Val Leu Ala Ala Leu Val Ala Cys Ile Ile Val Leu Gly Phe Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ala Ser Ser Arg Ser Val Asp Leu Gln Thr Arg Ile Met Glu
 35 40 45
 Leu Glu Gly Arg Val Arg Arg Ala Ala Ala Glu Arg Gly Ala Val Glu

50	55	60
Leu Lys Lys Asn Glu Phe Gln Gly Glu Leu Glu Lys Gln Arg Glu Gln		
65	70	75 80
Leu Asp Lys Ile Gln Ser Ser His Asn Phe Gln Leu Glu Ser Val Asn		
	85	90 95
Lys Leu Tyr Gln Asp Glu Lys Ala Val Leu Val Asn Asn Ile Thr Thr		
	100	105 110
Gly Glu Arg Leu Ile Arg Val Leu Gln Asp Gln Leu Lys Thr Leu Gln		
	115	120 125
Arg Asn Tyr Gly Arg Leu Gln Gln Asp Val Leu Gln Phe Gln Lys Asn		
	130	135 140
Gln Thr Asn Leu Glu Arg Lys Phe Ser Tyr Asp Leu Ser Gln Cys Ile		
	145	150 155 160
Asn Gln Met Lys Glu Val Lys Glu Gln Cys Glu Glu Arg Ile Glu Glu		
	165	170 175
Val Thr Lys Lys Gly Asn Glu Ala Val Ala Ser Arg Asp Leu Ser Glu		
	180	185 190
Asn Asn Asp Gln Arg Gln Gln Leu Gln Ala Leu Ser Glu Pro Gln Pro		
	195	200 205
Arg Leu Gln Ala Ala Gly Leu Pro His Thr Glu Val Pro Gln Gly Lys		
	210	215 220
Gly Asn Val Leu Gly Asn Ser Lys Ser Gln Thr Pro Ala Pro Ser Ser		
	225	230 235 240
Glu Val Val Leu Asp Ser Lys Arg Gln Val Glu Lys Glu Glu Thr Asn		
	245	250 255
Glu Ile Gln Val Val Asn Glu Glu Pro Gln Arg Asp Arg Leu Pro Gln		
	260	265 270
Glu Pro Gly Arg Glu Gln Val Val Glu Asp Arg Pro Val Gly Gly Arg		
	275	280 285
Gly Phe Gly Gly Ala Gly Glu Leu Gly Gln Thr Pro Gln Val Gln Ala		
	290	295 300
Ala Leu Ser Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu Met Glu Gly Pro Glu Arg		

16.

305		310		315		320									
Asp	Gln	Leu	Val	Ile	Pro	Asp	Gly	Gln	Glu	Glu	Glu	Gln	Glu	Ala	Ala
				325					330					335	
Gly	Glu	Gly	Arg	Asn	Gln	Gln	Lys	Leu	Arg	Gly	Glu	Asp	Asp	Tyr	Asn
			340					345					350		
Met	Asp	Glu	Asn	Glu	Ala	Glu	Ser	Glu	Thr	Asp	Lys	Gln	Ala	Ala	Leu
		355					360					365			
Ala	Gly	Asn	Asp	Arg	Asn	Ile	Asp	Val	Phe	Asn	Val	Glu	Asp	Gln	Lys
	370					375					380				
Arg	Asp	Thr	Ile	Asn	Leu	Leu	Asp	Gln	Arg	Glu	Lys	Arg	Asn	His	Thr
385					390					395					400
Leu															

<210> 9
 <211> 3520
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (40)..(1875)

<400> 9	
gaaattcagg ttaacgccat tgataaaggg attccttcc atg gca ggt cac agc	54
	Met Ala Gly His Ser
	1 5
atg gtc ctg gtg gaa att ctg gac gtg aat gac aat gtc cct gaa gta	102
Met Val Leu Val Glu Ile Leu Asp Val Asn Asp Asn Val Pro Glu Val	
	10 15 20
atg gtt act tca ctg tgc ctc cct gtg caa gag gat gct cag gtg ggt	150
Met Val Thr Ser Leu Ser Leu Pro Val Gln Glu Asp Ala Gln Val Gly	
	25 30 35
acc gtc att gcc ctg att agc gtg tgc gat cgt gac tct gga gcc aat	198
Thr Val Ile Ala Leu Ile Ser Val Ser Asp Arg Asp Ser Gly Ala Asn	
	40 45 50
gga cag gtc atc tgc tca ctg aca cct cat gtt ccc ttc aag ctg gtg	246

Gly	Gln	Val	Ile	Cys	Ser	Leu	Thr	Pro	His	Val	Pro	Phe	Lys	Leu	Val		
55						60					65						
tcc	acc	tac	aag	aat	tac	tac	tcg	ttg	gtg	ctg	gac	agc	gcc	ctg	gac	294	
Ser	Thr	Tyr	Lys	Asn	Tyr	Tyr	Ser	Leu	Val	Leu	Asp	Ser	Ala	Leu	Asp	85	
70					75					80							
cgc	gag	agc	gtg	tcg	gcc	tat	gag	ctg	gtg	gtg	act	gcg	cgg	gat	ggg	342	
Arg	Glu	Ser	Val	Ser	Ala	Tyr	Glu	Leu	Val	Val	Thr	Ala	Arg	Asp	Gly	100	
				90					95								
ggc	tcg	cct	tcg	ctg	tgg	gcc	acg	gct	aga	gtg	tcc	gtg	gag	gtg	gcc	390	
Gly	Ser	Pro	Ser	Leu	Trp	Ala	Thr	Ala	Arg	Val	Ser	Val	Glu	Val	Ala	115	
			105					110									
gac	gtg	aac	gac	aat	gcg	cct	gcg	ttc	gcg	cag	ccc	gag	tac	aca	gtg	438	
Asp	Val	Asn	Asp	Asn	Ala	Pro	Ala	Phe	Ala	Gln	Pro	Glu	Tyr	Thr	Val	130	
		120					125										
ttc	gtg	aag	gag	aac	aac	ccg	ccg	ggc	tgc	cac	atc	ttc	acg	gtg	tcg	486	
Phe	Val	Lys	Glu	Asn	Asn	Pro	Pro	Gly	Cys	His	Ile	Phe	Thr	Val	Ser	145	
	135					140											
gca	tgg	gac	gcg	gac	gcg	cag	aag	aac	gcg	ctg	gtg	tcc	tac	tcg	ctg	534	
Ala	Trp	Asp	Ala	Asp	Ala	Gln	Lys	Asn	Ala	Leu	Val	Ser	Tyr	Ser	Leu	165	
	150				155					160							
gtg	gag	cgg	cgg	gtg	ggc	gag	cac	gca	ctg	tcg	agc	tac	gtg	tcg	gtg	582	
Val	Glu	Arg	Arg	Val	Gly	Glu	His	Ala	Leu	Ser	Ser	Tyr	Val	Ser	Val	180	
				170					175								
cac	gcg	gag	agc	ggc	aag	gtg	tac	gcg	ctg	cag	ccg	cta	gac	cac	gag	630	
His	Ala	Glu	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Leu	Gln	Pro	Leu	Asp	His	Glu	195	
			185					190									
gag	ctg	gag	ctg	ctg	cag	ttc	cag	gtg	agc	gcg	cgc	gac	gcc	ggc	gtg	678	
Glu	Leu	Glu	Leu	Leu	Gln	Phe	Gln	Val	Ser	Ala	Arg	Asp	Ala	Gly	Val	210	
	200					205											
ccg	cct	ctg	ggc	agc	aac	gtg	acg	ctg	cag	gtg	ttc	gtg	ctg	gac	gag	726	
Pro	Pro	Leu	Gly	Ser	Asn	Val	Thr	Leu	Gln	Val	Phe	Val	Leu	Asp	Glu	225	
	215				220												
aac	gac	aac	gcg	ccg	gca	ctg	ctg	gcg	act	ccg	gct	ggc	agc	gca	gga	774	
Asn	Asp	Asn	Ala	Pro	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Pro	Ala	Gly	Ser	Ala	Gly	245	
	230				235					240							
ggc	gca	gtt	agc	gag	ttg	gta	ccg	cgg	tcg	gtg	ggt	gcg	ggc	cac	gtg	822	

Gly	Ala	Val	Ser	Glu	Leu	Val	Pro	Arg	Ser	Val	Gly	Ala	Gly	His	Val		
				250					255					260			
gtg	gcg	aaa	gtg	cg	gcg	gtg	gac	gct	gac	tcc	ggc	tat	aac	gct	tgg	870	
Val	Ala	Lys	Val	Arg	Ala	Val	Asp	Ala	Asp	Ser	Gly	Tyr	Asn	Ala	Trp		
			265					270					275				
ctg	tcc	tac	gag	ttg	caa	ccg	gcg	gcg	gtc	ggc	gcg	cac	atc	ccg	ttc	918	
Leu	Ser	Tyr	Glu	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	His	Ile	Pro	Phe		
			280				285					290					
cac	gtg	ggg	ctg	tac	act	ggc	gag	atc	agc	acg	aca	cg	atc	ctg	gat	966	
His	Val	Gly	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ile	Ser	Thr	Thr	Arg	Ile	Leu	Asp		
	295					300					305						
gag	gcg	gac	gct	ccg	cg	cac	cg	ctg	ctg	gtg	ctg	gtg	aag	gac	cac	1014	
Glu	Ala	Asp	Ala	Pro	Arg	His	Arg	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Lys	Asp	His		
310					315					320				325			
ggg	gag	ccc	gcg	ctg	acg	tcc	acg	gcc	acg	gtg	ctg	gtg	tcc	ctg	gtg	1062	
Gly	Glu	Pro	Ala	Leu	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Val	Leu	Val	Ser	Leu	Val		
			330					335						340			
gag	aac	ggc	cag	gcc	cca	aag	acg	tcc	tcc	cg	gcc	tca	gtg	ggc	gct	1110	
Glu	Asn	Gly	Gln	Ala	Pro	Lys	Thr	Ser	Ser	Arg	Ala	Ser	Val	Gly	Ala		
			345					350					355				
gtg	gat	ccc	gaa	gcg	gct	ctg	gtg	gat	att	aac	gtg	tac	ctc	atc	atc	1158	
Val	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Leu	Val	Asp	Ile	Asn	Val	Tyr	Leu	Ile	Ile		
		360				365						370					
gcc	atc	tgt	gcg	gtg	tcc	agc	ctg	ctg	gtg	ctc	acg	ctg	ctg	ttg	tac	1206	
Ala	Ile	Cys	Ala	Val	Ser	Ser	Leu	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Tyr		
	375					380					385						
act	gcg	ctg	cgt	tgc	tca	gcg	ccg	ccc	acc	gtg	agc	cg	tgc	gcg	ccg	1254	
Thr	Ala	Leu	Arg	Cys	Ser	Ala	Pro	Pro	Thr	Val	Ser	Arg	Cys	Ala	Pro		
390					395					400				405			
ggc	aag	ccc	acg	ctg	gtg	tgc	tcc	agc	gcc	gtg	ggg	agt	tgg	tct	tac	1302	
Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Val	Cys	Ser	Ser	Ala	Val	Gly	Ser	Trp	Ser	Tyr		
				410					415					420			
tcc	cag	cag	agg	agg	cag	agg	gtg	tgc	tct	gca	gag	agc	ccg	ccc	aag	1350	
Ser	Gln	Gln	Arg	Arg	Gln	Arg	Val	Cys	Ser	Ala	Glu	Ser	Pro	Pro	Lys		
			425				430						435				
acg	gac	ctc	atg	gcc	ttc	agc	cca	agc	ctt	cag	ctg	tct	cga	gaa	gat	1398	

Thr	Asp	Leu	Met	Ala	Phe	Ser	Pro	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Arg	Glu	Asp	
	440						445					450				
tgt	tta	aat	cct	ccc	agt	gaa	cca	cga	cag	ccc	aac	cct	gac	tgg	cgt	1446
Cys	Leu	Asn	Pro	Pro	Ser	Glu	Pro	Arg	Gln	Pro	Asn	Pro	Asp	Trp	Arg	
	455					460					465					
tac	tct	gcc	tcc	ctg	aga	gca	ggc	atg	cac	agc	tct	gtg	cac	cta	gag	1494
Tyr	Ser	Ala	Ser	Leu	Arg	Ala	Gly	Met	His	Ser	Ser	Val	His	Leu	Glu	
470					475					480					485	
gag	gct	ggc	att	cta	cgg	gct	ggc	cca	gga	ggg	cct	gat	cag	cag	tgg	1542
Glu	Ala	Gly	Ile	Leu	Arg	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Pro	Asp	Gln	Gln	Trp	
				490				495						500		
cca	aca	gta	tcc	agt	gca	aca	cca	gaa	cca	gag	gca	gga	gaa	gtg	tcc	1590
Pro	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Pro	Glu	Ala	Gly	Glu	Val	Ser	
			505					510					515			
cct	cca	gtc	ggc	gca	ggc	gtc	aac	agc	aac	agc	tgg	acc	ttt	aaa	tac	1638
Pro	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Val	Asn	Ser	Asn	Ser	Trp	Thr	Phe	Lys	Tyr	
		520					525					530				
gga	cca	ggc	aac	ccc	aaa	caa	tcc	ggc	ccc	ggc	gag	ttg	ccc	gac	aaa	1686
Gly	Pro	Gly	Asn	Pro	Lys	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Glu	Leu	Pro	Asp	Lys	
	535					540					545					
ttc	att	atc	cca	gga	tct	cct	gca	atc	atc	tcc	atc	cgg	cag	gag	cct	1734
Phe	Ile	Ile	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Ile	Ser	Ile	Arg	Gln	Glu	Pro	
550					555					560					565	
act	aac	agc	caa	att	gac	aaa	agt	gac	ttc	ata	acc	ttc	ggc	aaa	aag	1782
Thr	Asn	Ser	Gln	Ile	Asp	Lys	Ser	Asp	Phe	Ile	Thr	Phe	Gly	Lys	Lys	
				570					575					580		
gag	gag	acc	aag	aaa	aag	aag	aaa	aag	aag	aag	ggc	aac	aag	acc	cag	1830
Glu	Glu	Thr	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Gly	Asn	Lys	Thr	Gln	
			585					590					595			
gag	aaa	aaa	gag	aaa	ggg	aac	agc	acg	act	gac	aac	agt	gac	cag		1875
Glu	Lys	Lys	Glu	Lys	Gly	Asn	Ser	Thr	Thr	Asp	Asn	Ser	Asp	Gln		
	600						605					610				
tgagg	tcctc	aaatg	gaac	aagcc	actta	gccag	ttttt	gtaata	atgg	caa	atctctc					1935
ccatg	tagca	attcc	ctgct	cttttt	ctct	atctac	atga	gccct	cttag	agac	ctcaga					1995
aatct	gcaga	aagtt	ccctg	tgtct	gtcta	gaacg	cattt	aacag	gtttt	gtcgt	aaaag					2055

ctttactaag tctgggtgta actctttctc tccactctgg cttgttttca gaacctaaaa 2115
agcagaccca agtttccitt ctcctccgcc gcaaaggaga ggcttcccag ccccgccagt 2175
gagagggtgg actctctgcc ctgtgctccg gggatccigt cttgatgaca cttgcagggc 2235
aggctgaaaa gttttgagat tgagcagctt gggagtttgt ggccactggg tatgtgtagc 2295
taccgcgggt atgcgagtgc cagatatagg ctgagacgag ccagcttaga ctaattggta 2355
caaggaaggc aagaaaacaa agacaaataa acagcggaag ttatcagtat ggaggggaag 2415
tgtaaactta aagggaaccag actttctaaa tcttacaact caagagggtg cagccaccci 2475
ctaggagaca aaactacccc cactgacaag gcttaggag accctaaagt ctgttggctg 2535
tgacgtcatt atacctaaaa tctgcatcat acctgcaagc caacagttca gtgttttaac 2595
agagaaccac cctgggaaac agaagcagat ctgatgtgtt tcctatacat gtcctgtgct 2655
cactttatta aaaattcttt tgcacacaat gtttatgaaa aggccagatc cttttccaat 2715
acttatgcaa aagcaaaaga aaaccccgac acctcacctt tcgctgtttg ttgtttcata 2775
gatttattta aaaaaagaga aagtctatag ctataaatct ttaaagagaa atatgaatac 2835
aattccccta aactctctc aaaagagaat tcagcttaca gccattttaa tgatcattgc 2895
tgctacagaa gtgctttaag agaattgcct gaaacatctg tattatatcg gccacctgcc 2955
aatcacagct ttactctttc aggtcactct ggggctgcct cttgcatgta ttactaaata 3015
aaatgatctc tctttctctc tctctctctc ttttctaaga aacaattatg tgcactttga 3075
tacacaacct tctctaacca actatatatc aagacccaaa aattgaagaa aaatatgtt 3135
ttctcataca gtgagcggat ttttcaatct actaattctg tgacttgtct tgggtgtgcta 3195
gcctacacct tctcttttgt ttagttttcc ttttctataa cactctgaat tgctaattct 3255
actaacacct atgatgttac ctgaaatcaa tctcccatat gtatgctgta tgctatgcta 3315
agactcctga aatatactta ctctgtgctt gtgtatgta atgttaatgc aactattacc 3375
tagagtgaac ttttaagcttt attgttgaat gtaattccat tatatttcct ttgttacacc 3435
tgtgaaaaag tggagtagtg tttttttaac cattgttaat cagcttttgt gtatgaaaga 3495

cacagtaaaa tttctttctt aaatc

3520

<210> 10

<211> 612

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met	Ala	Gly	His	Ser	Met	Val	Leu	Val	Glu	Ile	Leu	Asp	Val	Asn	Asp
1				5					10					15	

Asn	Val	Pro	Glu	Val	Met	Val	Thr	Ser	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Gln	Glu
			20					25					30		

Asp	Ala	Gln	Val	Gly	Thr	Val	Ile	Ala	Leu	Ile	Ser	Val	Ser	Asp	Arg
		35					40					45			

Asp	Ser	Gly	Ala	Asn	Gly	Gln	Val	Ile	Cys	Ser	Leu	Thr	Pro	His	Val
	50					55					60				

Pro	Phe	Lys	Leu	Val	Ser	Thr	Tyr	Lys	Asn	Tyr	Tyr	Ser	Leu	Val	Leu
	65					70				75					80

Asp	Ser	Ala	Leu	Asp	Arg	Glu	Ser	Val	Ser	Ala	Tyr	Glu	Leu	Val	Val
				85					90					95	

Thr	Ala	Arg	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Ser	Leu	Trp	Ala	Thr	Ala	Arg	Val
			100					105					110		

Ser	Val	Glu	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Asp	Asn	Ala	Pro	Ala	Phe	Ala	Gln
		115					120					125			

Pro	Glu	Tyr	Thr	Val	Phe	Val	Lys	Glu	Asn	Asn	Pro	Pro	Gly	Cys	His
	130					135					140				

Ile	Phe	Thr	Val	Ser	Ala	Trp	Asp	Ala	Asp	Ala	Gln	Lys	Asn	Ala	Leu
145					150				155						160

Val	Ser	Tyr	Ser	Leu	Val	Glu	Arg	Arg	Val	Gly	Glu	His	Ala	Leu	Ser
				165					170					175	

Ser	Tyr	Val	Ser	Val	His	Ala	Glu	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Leu	Gln
				180				185					190		

Pro	Leu	Asp	His	Glu	Glu	Leu	Glu	Leu	Leu	Gln	Phe	Gln	Val	Ser	Ala
		195					200					205			

Arg Asp Ala Gly Val Pro Pro Leu Gly Ser Asn Val Thr Leu Gln Val
 210 215 220
 Phe Val Leu Asp Glu Asn Asp Asn Ala Pro Ala Leu Leu Ala Thr Pro
 225 230 235 240
 Ala Gly Ser Ala Gly Gly Ala Val Ser Glu Leu Val Pro Arg Ser Val
 245 250 255
 Gly Ala Gly His Val Val Ala Lys Val Arg Ala Val Asp Ala Asp Ser
 260 265 270
 Gly Tyr Asn Ala Trp Leu Ser Tyr Glu Leu Gln Pro Ala Ala Val Gly
 275 280 285
 Ala His Ile Pro Phe His Val Gly Leu Tyr Thr Gly Glu Ile Ser Thr
 290 295 300
 Thr Arg Ile Leu Asp Glu Ala Asp Ala Pro Arg His Arg Leu Leu Val
 305 310 315 320
 Leu Val Lys Asp His Gly Glu Pro Ala Leu Thr Ser Thr Ala Thr Val
 325 330 335
 Leu Val Ser Leu Val Glu Asn Gly Gln Ala Pro Lys Thr Ser Ser Arg
 340 345 350
 Ala Ser Val Gly Ala Val Asp Pro Glu Ala Ala Leu Val Asp Ile Asn
 355 360 365
 Val Tyr Leu Ile Ile Ala Ile Cys Ala Val Ser Ser Leu Leu Val Leu
 370 375 380
 Thr Leu Leu Leu Tyr Thr Ala Leu Arg Cys Ser Ala Pro Pro Thr Val
 385 390 395 400
 Ser Arg Cys Ala Pro Gly Lys Pro Thr Leu Val Cys Ser Ser Ala Val
 405 410 415
 Gly Ser Trp Ser Tyr Ser Gln Gln Arg Arg Gln Arg Val Cys Ser Ala
 420 425 430
 Glu Ser Pro Pro Lys Thr Asp Leu Met Ala Phe Ser Pro Ser Leu Gln
 435 440 445
 Leu Ser Arg Glu Asp Cys Leu Asn Pro Pro Ser Glu Pro Arg Gln Pro
 450 455 460

Asn Pro Asp Trp Arg Tyr Ser Ala Ser Leu Arg Ala Gly Met His Ser
465 470 475 480

Ser Val His Leu Glu Glu Ala Gly Ile Leu Arg Ala Gly Pro Gly Gly
485 490 495

Pro Asp Gln Gln Trp Pro Thr Val Ser Ser Ala Thr Pro Glu Pro Glu
500 505 510

Ala Gly Glu Val Ser Pro Pro Val Gly Ala Gly Val Asn Ser Asn Ser
515 520 525

Trp Thr Phe Lys Tyr Gly Pro Gly Asn Pro Lys Gln Ser Gly Pro Gly
530 535 540

Glu Leu Pro Asp Lys Phe Ile Ile Pro Gly Ser Pro Ala Ile Ile Ser
545 550 555 560

Ile Arg Gln Glu Pro Thr Asn Ser Gln Ile Asp Lys Ser Asp Phe Ile
565 570 575

Thr Phe Gly Lys Lys Glu Glu Thr Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
580 585 590

Gly Asn Lys Thr Gln Glu Lys Lys Glu Lys Gly Asn Ser Thr Thr Asp
595 600 605

Asn Ser Asp Gln
610

<210> 11

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligo-cap Linker

<400> 11

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg

30

<210> 12

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

gcggctgaag acggcctatg tggccttttt tttttttttt tt

42

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

agcatcgagt cggccttggt g

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

gcggctgaag acggcctatg t

21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

gtggatgcga tctgtctctc c

21

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 16
tgcagaaagg aacacatgct g

21

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 17
cttccatgct tcagctgtgg

20

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 18
gccctggctct gtatacctgg g

21

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 19
ctacgacctg agccagtgca 20

<210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 20
gagggcttgg agctgctgt 19

<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 21
gcattctacg ggctgggcc 19

<210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22
gggttgccctg gtccgtatt 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04515

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12N 5/10, A61K 45/00, A61K 48/00, A61K 31/711, A61P 25/28, G01N 33/15, G01N 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12N 5/10, A61K 45/00, A61K 48/00, A61K 31/711, A61P 25/28, G01N 33/15, G01N 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), EMBL/DDBJ/GENBANK/GENESEQ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/21328, A2 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER), 22 May, 1998 (22.05.98), Claims & AU, 9748852, A & EP, 941320, A	1-10
X	GAVIN B. J., et al., "Expression of multiple novel Wnt-1/int-1- related genes during fetal and adult mouse development", Genes & Development (1990), Vol.4, No.12B, p.2319-2332	1-10
EX	WO, 99/55865, A1 (GENESIS RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION LIMITED), 04 November, 1999 (04.11.99), Claims & AU, 99/55865, A	1-10
EX	EP, 979870, A1 (SMITHKLINE BEECHAM PLC), 16 February, 2000 (16.02.00) & JP, 2000-60575, A & CA, 2248989, A	1-10
A	DU Y., et al. "α2-Macroglobulin attenuates β-amyloid peptide 1-40 fibril formation and associated	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
31 July, 2000 (31.07.00)

Date of mailing of the international search report
15 August, 2000 (15.08.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04515

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	neurotoxicity of cultured fetal rat", Journal of Neurochemistry(1998), Vol.70, No.3, p.1182-1188	
A	PALLITO M. M., et al., "Recognition sequence design for peptidyl modulators of β -amyloid aggregation and toxicity", Biochemistry (Mar.1999), Vol.38, No.12, p.3570-3578	1-17
A	GHANTA J., et al., "A strategy for designing inhibitors of β -amyloid toxicity", Journal of Biological Chemistry (1996), Vol.271, No.47, p.29525-29528	1-17
EA	LEVINE H. III, et al., "Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T", Methods in Enzymology (Oct.1999), Vol.309, p.274-284	1-17

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/04515

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12N 5/10, A61K 45/00, A61K 48/00, A61K 31/711, A61P 25/28, G01N 33/15, G01N 33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12N 5/10, A61K 45/00, A61K 48/00, A61K 31/711, A61P 25/28, G01N 33/15, G01N 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), EMBL/DBJ/GENBANK/GENSEQ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/21328, A2 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER) 22. 5月. 1998 (22. 05. 98), 特許請求の範囲 & AU, 9748852, A & EP, 941320, A	1-10
X	GAVIN B. J., et al. "Expression of multiple novel Wnt-1/int-1- related genes during fetal and adult mouse development", Genes & Development (1990), Vol. 4, No. 12B, p. 2319-2332	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31. 07. 00

国際調査報告の発送日

15.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N

9152

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 99/55865, A1 (GENESIS RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION LIMITED) 4. 11月. 1999 (04. 11. 99), 特許請求の範囲 & AU, 99/55865, A	1-10
P, X	EP, 979870, A1 (SMITHKLINE BEECHAM PLC) 16. 2月. 2000 (16. 02. 00) & JP, 2000-60575, A & CA, 2248989, A	1-10
A	DU Y., et al. "α2-Macroglobulin attenuates β-amyloid peptide 1-40 fibril formation and associated neurotoxicity of cultured fetal rat", Journal of Neurochemistry (1998), Vol. 70, No. 3, p. 1182-1188	1-17
A	PALLITO M. M., et al. "Recognition sequence design for peptidyl modulators of β-amyloid aggregation and toxicity", Biochemistry (Mar. 1999), Vol. 38, No. 12, p. 3570-3578	1-17
A	GHANTA J., et al. "A strategy for designing inhibitors of β-amyloid toxicity", Journal of Biological Chemistry (1996), Vol. 271, No. 47, p. 29525-29528	1-17
P, A	LEVINE H. III, et al. "Quantification of β-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T", Methods in Enzymology (Oct. 1999), Vol. 309, p. 274-284	1-17